

Aus dem Med. Zentrum für Nervenheilkunde

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. C. Krieg

Klinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. W. H. Oertel

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Rolle von α -Synuclein
im MPTP- und 6-OHDA-Modell
des Morbus Parkinson**



Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jan Westrich

aus Karlsruhe

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 23.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Rothmund

Referent: Prof. Dr. A. Hartmann

Korreferent: Prof. Dr. R. C. Dodel

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Morbus Parkinson	9
1.2 Hirnregionen und Verschaltungen	
1.2.1 Die Basalganglien	11
1.2.2 Die Substantia nigra	12
1.2.3 Das Ventrale Tegmentum	13
1.3 Dopaminstoffwechsel	
1.3.1 Biosynthese des Dopamins	13
1.3.2 Vesikulärer Monoamintransporter 2 (VMAT2)	14
1.3.3 Dopamintransporter (DAT)	15
1.3.4 Abbau des Dopamins	16
1.4 Parkinson Modelle	17
1.4.1 MPTP	
1.4.1.1 Das MPTP-Parkinson-Modell	17
1.4.1.2 MPTP-Toxizität	19
1.4.1.3 Das MPTP-Modell in Anwendung	22
1.4.2 6-OHDA	
1.4.2.1 Das 6-OHDA-Parkinson-Modell	23
1.4.2.2 6-OHDA-Toxizität	24
1.4.2.3 Das 6-OHDA Modell in Anwendung	25
1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	
1.5.1 Funktionen des UPS	26
1.5.2 Der UPS-Kreislauf	27
1.6 α -Synuclein (α -Syn)	
1.6.1 Entdeckung des α -Syn	28
1.6.2 Proteinstruktur des α -Syn	29

1.6.3 Die Synuclein-Familie	31
1.6.4 Vorkommen im Menschen	31
1.6.5 Physiologie	33
1.6.5.1 α -Syn als Chaperonprotein	33
1.6.5.2 α -Syn als Regulator von Proteinen	34
1.6.5.3 Funktionen im Dopaminstoffwechsel	34
1.6.5.4 α -Syn als präsynaptischer Regulator	34
1.6.5.5 α -Syn und Dopamin	36
1.6.5.6 Aggregatbildung des α -Syn	37
1.6.5.7 Expression von α -Syn	38
1.7 α -Syn in Parkinson-Modellen	
1.7.1 α -Syn und MPTP	39
1.7.2 α -Syn und 6-OHDA	40
1.8 Ziele der Arbeit	41

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung	42
2.2 Eingesetzte Substanzen	
2.2.1.1 Pharmaka	42
2.2.1.2 Verwendete Lösungen und deren Herstellung	43
2.2.2 Substanzen und Chemikalien für	
2.2.2.1 Operationsvorbereitung	43
2.2.2.2 Intraperitoneale MPTP-Injektion	44
2.2.2.3 Salicylat-Assay	44
2.2.2.4 Stereotaktische Injektion	44
2.2.2.5 HPLC	44
2.2.2.5.1 Zur Bestimmung von DA, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA	44
2.2.2.5.2 Zur Bestimmung von MPP ⁺ und Salicylat	45
2.2.2.6 Referenzsubstanzen für die Eichlösungen	45
2.2.2.7 Anfertigen und Fixieren der Gehirnschnitte	45
2.2.2.8 Immunhistochemische Färbung	45

2.3	Verwendete Geräte	
2.3.1	Stereotaktische Operation	46
2.3.2	Herstellung der Homogenate	46
2.3.3	HPLC	47
2.3.3.1	Geräte zur Bestimmung von DA, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA	47
2.3.3.2	Geräte zur Bestimmung von MPP ⁺ und Salicylat	47
2.3.4	Stereologisches Verfahren	48
2.4	Das MPTP-Parkinson-Maus-Modell	
2.4.1	MPTP-Parkinson Modelle	48
2.4.2	Versuchsdurchführung	48
2.4.3	Bestimmung von MPP ⁺	49
2.4.4	Salicylat-Assay	49
2.5	Stereotaktische Operation	
2.5.1	Vorbereitung und Durchführung	50
2.5.2	Injektion der 6-OHDA-Lösung	51
2.6	Entnahme und Verarbeitung des Gehirns	
2.6.1	Entnahme des Gehirns	52
2.6.2	Herstellung des Homogenats	52
2.6.3	Analyse der Homogenate	52
2.6.4	Bestimmung von Dopamin, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA	53
2.6.5	Bestimmung von MPP ⁺ und Salicylat	53
2.6.6	Herstellung des Fließmittels	54
2.7	Anfertigen der Gehirnschnitte	
2.7.1	Fixierung des Gehirns	54
2.7.2	Immunhistochemische Färbemethode	54
2.8	Stereologisches Verfahren	
2.8.1	Das C.A.S.T. System	56
2.8.2	Durchführung und Vorbereitung	56
2.8.3	Einstellungen und Zählkriterien	57
2.9	Statistische Auswertung	58

3. Ergebnisse

3.1 Tierüberleben und Allgemeines	59
3.2 Subchronische MPTP-Behandlung	59
3.2.1 Dopamin-, DOPAC- und HVA-Konzentration im Striatum	60
3.2.2 TH-positive Neurone in der SNc und VTA	67
3.3 Unilaterale 6-OHDA-Behandlung	69
3.3.1 Dopamin- und DOPAC-Konzentration im Striatum	69
3.3.2 TH-positive Neurone in der SNc und VTA	71
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	75

4. Diskussion 76

4.1 MPTP-Intoxikation	
4.1.1 Schädigung des nigrostriatalen Systems durch MPTP in α -Syn KO Tieren	79
4.1.2 Entwicklung von freien Radikalen nach MPTP in α -Syn KO Tieren	82
4.1.3 Die Rolle von α -Syn im MPTP-Modell	83
4.2 6-OHDA-Behandlung	
4.2.1 Schädigung des nigrostriatalen Systems durch 6-OHDA in α -Syn KO Tieren	84
4.2.2 Die Rolle von α -Syn im 6-OHDA-Modell	86
4.3 Mechanismen der Zellschädigung von α -Syn	88

5. Zusammenfassung 91

Anhang

6. Literaturverzeichnis	93
7. Abkürzungsverzeichnis	126
8. Bildnachweis	129
9. Verzeichnis der akademischen Lehrer	130
10. Danksagung	131

1. Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Erste Überlieferungen dieser Krankheit stammen aus dem Jahre 1500 v.Chr. In den ajurvedischen Schriften wurden an Betroffenen gemachte Beobachtungen niedergeschrieben und zu einem Erscheinungsbild zusammengefügt. Von Symptomen wie Zittern der Hände, körperlicher Steifheit und Bewegungsarmut des Betroffenen wird erzählt. Auch in den griechischen und römischen Überlieferungen (300 v.Chr. und 200 n.Chr.) wurden die Symptome, allen voran das stigmatisierende Zittern der Betroffenen beschrieben. 1817 veröffentlichte der Londoner Arzt James Parkinson (1755-1824) seine klassische Studie über die „Schüttellähmung“ (lat. *paralysis agitans*) und heute nach ihm benannten Krankheit: *„An essay on the shaking palsy“*. Darin beschrieb er die Symptomatik des M. Parkinson und erfasste sie erstmals als eine klinische Einheit: *„Unwillkürliche Zitterbewegung, bei verminderter Muskelkraft in Körperteilen, die keine Tätigkeit ausführen selbst dann, wenn sie unterstützt werden; mit einem Drang, den Rumpf vorzubeugen und vom Gehen in den Laufschriftt überzuwechseln; dabei sind Sinne und Verstand unversehrt“*. Parkinson wies darauf hin, dass die Krankheit *„unmerklich beginnt und langsam fortschreitet“*. Damit beschrieb er treffend die Symptome und den Verlauf der Erkrankung, an deren Gültigkeit sich bis heute nichts geändert hat.

Parkinson-Syndrome sind definiert durch das Vorliegen einer Akinese und eines der folgenden, in unterschiedlicher Gewichtung auftretenden Kardinalsymptomen: Rigor, Ruhetremor, posturale Instabilität.

Oft treten als Frühsymptom Störungen der Schrift (Mikrographie) auf. Hinzu kommen sehr häufig Störungen der Sprache (Dysarthrophonie) und vegetative Dysfunktionen, z.B. eine Seborrhoe mit typischem Salbengesicht, nächtliches Schwitzen, Harnverhalt, Obstipationen, orthostatische Hypotonien und eine Hypersalivation. Im Laufe der Krankheit leiden etwa die Hälfte der Patienten unter einer depressiven Verstimmung [Mimura, et al. 2007] und etwa knapp ein Drittel unter einem progredienten dementiellen Prozess [Halvorsen, et al. 2007]. Die klassischen Symptome können auch

bei atypischen Parkinson-Syndromen vorhanden sein. Dieses Syndrom kann ausgelöst werden durch eine Vielzahl von Medikamenten (Rigor und Akinese v.a. bei trizyklischen Neuroleptika) und Drogen (Methamphetamine, Ecstasy), aber auch durch Toxine (Mangan, Kohlenmonoxid, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), Rotenon), Enzephalitiden, schwere Hypoxien, vaskuläre, traumatische Hirnschädigungen und im Rahmen systemischer Krankheiten wie dem M. Wilson, Normaldruck-Hydrozephalus, M. Alzheimer, sowie neurologischer Systemdegenerationen Multisystematrophie (MSA), progressive supranukleäre Blickparese (Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom) und Hallervorden-Spatz-Syndrom (in der Mehrzahl Mutationen des PANK2-Gens).

Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist mit einer Prävalenz von 100-200/100000 Einwohnern in Deutschland eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Weltweit schätzt man die Zahl der Erkrankten auf 5 - 30 Millionen, damit ist der M. Parkinson nach dem M. Alzheimer die zweithäufigste neurologische degenerative Erkrankung. Die ätiologische Ursache der Erkrankung ist in der Mehrzahl der Fälle unbekannt. Mit dem Alter nimmt auch das Erkrankungsrisiko zu. So sind ca. 1% der über 60-jährigen und ca. 2,2% der über 85-jährigen erkrankt. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 62,4 Jahren. Etwa 4-10 % davon sind unter 40 Jahre alt. Männer haben gegenüber Frauen ein leicht erhöhtes Risiko [Dluzen & McDermott 2000; de Lau, et al. 2004]. Die Krankheit weist wie die Multiple Sklerose regionale Unterschiede auf und neben Umweltfaktoren scheinen noch weitere zum Ausbruch der Krankheit beizutragen [Chen, et al. 2001; Corti, et al. 2005; Gorell, et al. 2006; Hellenbrand, Vieregge, et al. 1993; Kuopio, et al. 1999]. In familiär gehäuft vorkommenden M. Parkinson, stieß man im Erbgut der Betroffenen auf mutierte Gene (autosomal-rezessive Gene wie Parkin, DJ-1 und Pink-1), die zu einem tieferen Verständnis der Erkrankung geführt haben [Morris 2005]. Neben dem genetischen Aspekt geht man davon aus, dass oxidativer und nitrosativer Stress, Störungen der mitochondrialen Funktionen, Ablagerungen von Proteinen wie z.B. die Dysfunktion des Ubiquitin-Proteasom Systems auf molekularer Ebene bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen [Jenner 1991; Jenner & Olanow 1998; Moore, et al. 2005].

Pathophysiologisch liegt ein Verlust der dopaminbildenden Zellen in der Substantia nigra (SN) zugrunde und damit ein Ausfall nigrostriataler Bahnen und konsekutiven striatalen Dopamindefizit, wobei Symptome erst bei einem Verlust von über 50% der dopaminergen Neurone auftreten. Der M. Parkinson ist allerdings eine

neurodegenerative Erkrankung des gesamten Gehirns und beschränkt sich nicht nur auf den Untergang dopaminergere Zellen in der Substantia nigra. Dennoch setzen hier medikamentöse Therapien an und behandeln die Krankheit durch Gabe von Dopaminagonisten, MAO-B- (Monoaminoxidase-B), COMT- (Catechol-O-Methyltransferase) –Hemmern und Gabe von Levodopa, einer Vorstufe des Dopamins. Daneben wird in manchen Fällen die Möglichkeit einer neurochirurgischen Intervention genutzt, insbesondere die Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus.

1.2 Hirnregionen und Verschaltungen

1.2.1 Die Basalganglien

Die Basalganglien sind eine subkortikal gelegene funktionelle Einheit des motorischen Systems. Sie übernehmen wichtige Funktionen in der Abstimmung von motorischen Leistungen. Störungen in diesen Bereich führen zu vielfältigen Krankheitsmustern. Als graue Substanz im Marklager liegend werden sie in das Striatum, das Pallidum, der Ncl. subthalamicus (NST) und das Claustrum eingeteilt. Das Striatum setzt sich aus zwei Teilen, dem Putamen und dem schweiförmigen Ncl. caudatus (NC) zusammen, welche entwicklungsgeschichtlich aus einer gemeinsamen Anlage entstammen und erst durch die einsprossende Capsula interna voneinander getrennt wurden.

Exzitatorische Afferenzen über die Neurotransmitter Glutamat (Glu) und Aspartat (Asp) erhält das Striatum aus nahezu allen Großhirnrindenarealen (fast ausschließlich ipsilateral, v.a. aus dem motorischen, sensorischen und präfrontalen Assoziationskortex) und dem Thalamus. Hemmende dopaminerge Afferenzen stammen aus der Substantia nigra. Das Striatum besitzt sowohl auf die Motorik hemmend und fördernd wirkende Efferenzen. Über acetylcholinerge Zwischenneurone des Striatums werden Efferenzen an das Pallidum Pars externa ausgesandt, die über die Neurotransmitter GABA und Enkephalin (Enk) vermittelt werden. Das Pallidum liegt medial vom Striatum und besteht aus einem nach medial konisch zulaufenden Anteil Pars interna (GPi) und einem lateralen Anteil Pars externa (GPe), dessen hemmende GABAerge (Neurotransmitter ist γ -Aminobuttersäure) Neurone in den NST projizieren. Exzitatorische glutamaterge Efferenzen des NST ziehen in die Substantia nigra Pars reticularis (SNr) und den GPi. GABAerge Neurone des GPi ziehen zum

Thalamus, dessen glutamaterge Efferenzen in den motorischen Kortex projizieren. Damit wirkt sich eine inhibitorische Wirkung auf den GPi fördernd und auf den GPe hemmend auf die Motorik aus. Folglich haben die aus dem Striatum zum GPi (direkter Weg über D1-Rezeptoren) und zur Substantia nigra ziehenden monosynaptisch verschalteten Efferenzen mit den Neurotransmittern GABA, Substanz P (SuP) und Dynorphin (Dyn) einen Motorik fördernden Einfluß, wohingegen die vom Striatum zum GPe ziehenden Efferenzen (indirekter Weg über D2-Rezeptoren) einen hemmenden Einfluß auf die Motorik besitzen [Albin, et al. 1995; Lang & Lozano 1998] [siehe Abb.1.1].

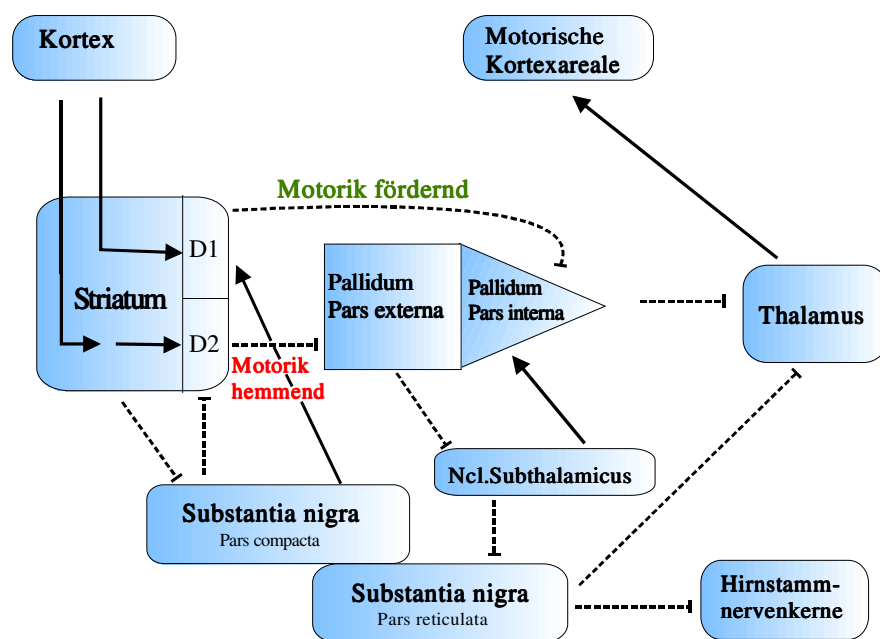


Abb.1.1: Verschaltung der Basalganglien nach Lang [Lang & Lozano 1998]

1.2.2 Die Substantia nigra (SN)

Die Substantia nigra ist ein breiter Komplex grauer Substanz und liegt an der Grenze von Hirnschenkeln und mesencephalen Tegmentum. Sie gehört streng genommen neuroanatomisch nicht zu den Basalganglien, spielt aber eine wichtige Rolle in ihrem Verschaltungsschema. Die schwarze Farbe, an der man die Substantia nigra leicht erkennen kann und von der sie ihren Namen hat, entsteht durch den hohen Gehalt an Neuromelanin in den Perikaryen (welches wie das Dopamin (DA) aus der Aminosäure (AS) Tyrosin hergestellt wird). Dieses Melanin kommt interessanterweise nur beim Menschen und höheren Primaten vor und fehlt z.B. in der Ratte oder der Maus. Die SN gliedert sich mikroskopisch in eine dorsale Pars compacta (SNc) und eine ventral

gelegene Pars reticularis (SNr). Ihre Afferenzen erhält sie von der Großhirnrinde (prä-, motorischer und präzentraler Kortex) und vom Striatum. Die dopaminergen und vorwiegend hemmenden Efferenzen der Pars compacta (SNc) projizieren v.a. ins Striatum. GABAerge Efferenzen aus der Pars reticularis (SNr) wirken inhibitorisch auf den Thalamus und die Hirnstammnervenerne. Ebenfalls sendet die Substantia nigra Efferenzen in die Formatio reticularis und ins limbische System.

Bei einem Ausfall der Substantia nigra überwiegen hemmende Einflüsse der Basalganglien auf die Motorik und führen zu Parkinsonismus.

1.2.3 Das Ventrale Tegmentum (VTA)

Die Funktion der VTA ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Die VTA enthält dopaminerge und serotoninerge Neurone, deren Efferenzen sich in 5 Unterklassen aufteilen lassen: die nicht dopaminergen mesorhombischen, mesodienzephalischen Efferenzen und die dopaminergen mesostriatalen, mesolimbischen, mesocorticalen Efferenzen. Die VTA erhält aus den meisten Hirnarealen, in die sie projiziert, auch Afferenzen. Quantitativ gesehen ist die Anzahl der Afferenzen aus dem Septum-Hippocampus Komplex und dem limbischen System am geringsten [Oades & Halliday 1987].

Interessanterweise sind die Neurone der VTA, obwohl in dichter Nachbarschaft zur SN, beim M. Parkinson weniger schwer betroffen [Hirsch, et al. 1988].

1.3 Dopaminstoffwechsel

1.3.1 Biosynthese des Dopamins

Dopamin ist ein Neurotransmitter und gehört in die Gruppe der Katecholamine. Katecholamine sind biogene Amine, deren Moleküle alle eine Dihydroxyphenyl-Gruppe (engl.:“catechol“) besitzen. Die Vorstufe aller Katecholamine ist die aromatische AS Tyrosin, die im Körper aus der essentiellen AS Phenylalanin synthetisiert werden kann. Sie wird Na^+ -abhängig aktiv in das Zytoplasma aufgenommen. Aus ihr werden durch enzymatische Prozesse auch das Dopamin hergestellt, welches seinerseits die Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin ist. Eine Hydroxylierung (Tyrosin-3-Monooxygenase oder auch Tyrosin-Hydroxylase) führt zu Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) und durch die anschließende Decarboxylierung

(aromatische-L-AS-Decarboxylase oder Dopa-Decarboxylase) entsteht Dopamin. Durch weitere Hydroxylierung und Methylierung entstehen Noradrenalin und Adrenalin. Die Geschwindigkeit der Synthese wird durch die Tyrosinhydroxylase (TH) bestimmt und unterliegt einer Rückkopplungsregulation durch die gebildeten Endprodukte. Die TH ist in der Lage Superoxidradikale ($O_2^{\cdot-}$) zu erzeugen [Adams, et al. 1997], die wiederum mit anderen Radikalen reagieren können. Dopamin kann unter Anwesenheit von Sauerstoff und physiologischem pH spontan oxidieren und unter Freisetzung von Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) in das toxische, reaktive Dopamin-Quinone übergehen [Graham 1978]. Dopamin-Quinone können den Komplex I der Atmungskette hemmen und zu einem ATP Verlust führen [Lotharius & Brundin 2002].

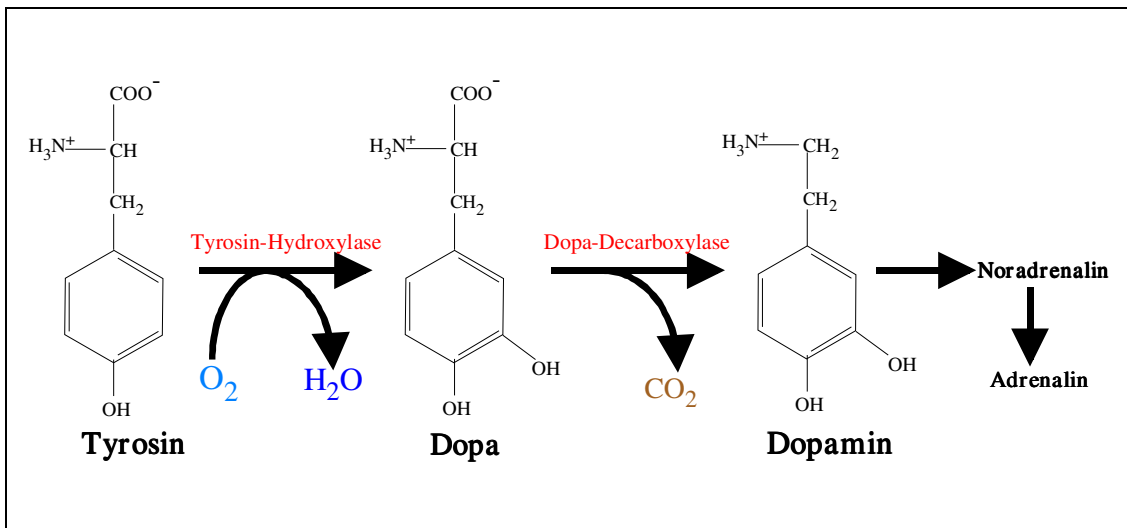


Abb.1.2: Biosynthese des Dopamins (mod. aus Koolmann, Röhms Taschenatlas der Biochemie)

1.3.2 Vesikulärer Monoamintransporter 2 (VMAT2)

Nach der Synthese wird das Dopamin über den protonenabhängigen VMAT2 in die Vesikel der terminalen Nervenendigungen aufgenommen und dort in protonierter Form (zusammen mit ATP, Mg^{2+} , dem Protein Chromogranin und anderen Kotransmittern) in einer stabilen Form gespeichert [Takahashi, et al. 1997]. Der benötigte Protonengradient wird durch eine Mg^{2+} -abhängige Protonenpumpe (H^+ -ATPase) erzeugt [Oberdisse, Pharmakologie und Toxikologie 2002]. Bei ankommenden Nervenimpuls am Ende des neuronalen Axons, öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle und die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt kurzfristig an. Dadurch es kommt zum Andocken und zur Verschmelzung einiger

1.3.4 Abbau des Dopamins

Der Abbau von Dopamin erfolgt hauptsächlich über die Monoaminoxidase-B (MAO-B) und die Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT). MAO kommt in zwei Isoformen vor (MAO-A und MAO-B) und ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Beide können beim Menschen Dopamin abbauen. Über Zwischenstufen entstehen beim Abbau die Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA). Auch während des Dopaminabbaus durch die MAO-B können toxische Moleküle entstehen. Wird über die MAO-B Dopamin abgebaut, entsteht das reaktive H_2O_2 [Maker, et al. 1981], welches in einer von Eisen katalysierten Reaktion (Fenton Reaktion) in das hochreaktive Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) überführt werden kann [Youdim, et al. 1989].

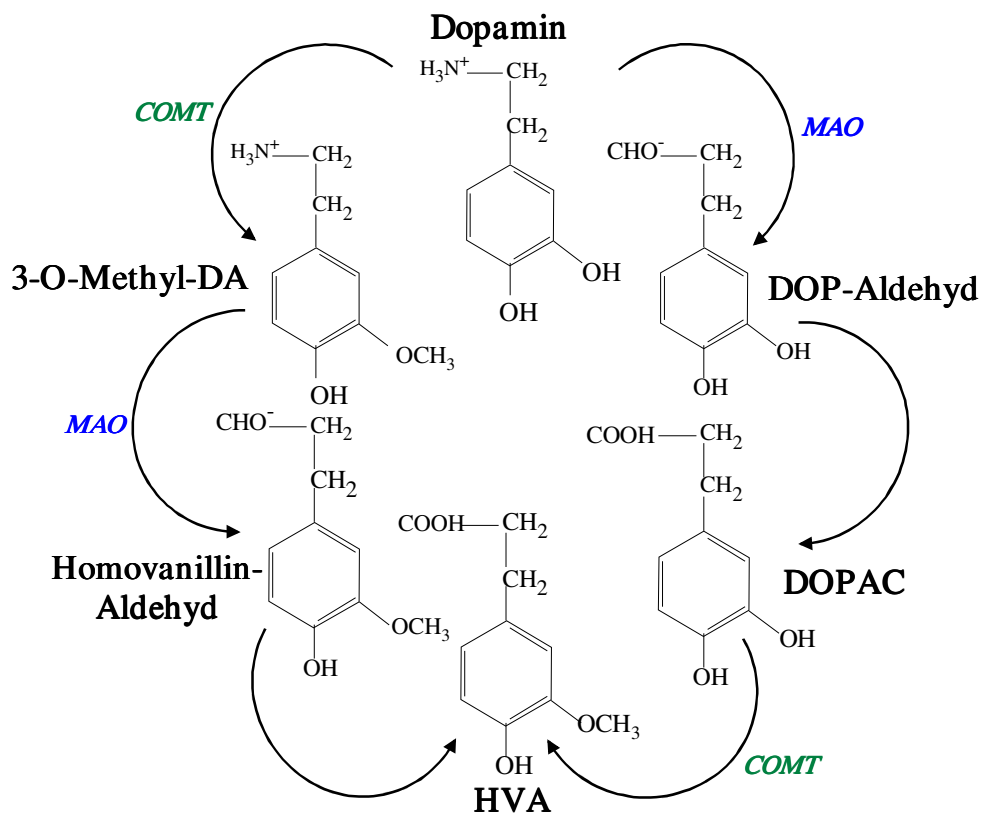


Abb.1.4: Schematische Darstellung des enzymatischen Dopaminabbaus..

1.4 Parkinson-Modelle

Es gibt mehrere Modelle, die Aspekte der Pathophysiologie des M. Parkinson verschieden gut darstellen können. Die häufigsten sind das 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP)- und das 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Modell.

1.4.1 MPTP

1.4.1.1 Das MPTP-Parkinson-Modell

1983 traten im Norden Kaliforniens bei jungen Erwachsenen, die eine neu auf den Markt gekommene „Designer-Droge“ 1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionpiperidin (MPPP, einem Analog des Meperidins) konsumierten, Parkinson-ähnliche Symptome auf. Durch Untersuchungen fand man eine Substanz, das Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), welches ursächlich für die aufgetretenen Symptome zu sein schien [Langston & Ballard 1983; Langston 1987]. Durch Verunreinigungen, die während der Herstellung der neuen Droge auftraten, entstand das MPTP als Nebenprodukt aus dem Meperidin-Derivat (1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionoxy-Piperidin (MPPP)). MPTP verursachte in Tierversuchen einen Zelluntergang in der SN, erniedrigte den Dopamin- und Metabolitengehalt (DOPAC, HVA) im Striatum, behandelte Tiere sprachen auf eine L-Dopa Therapie an und untersuchte Gehirne zeigten eosinophile Einschlusskörperchen [Langston 1987; Langston & Irwin 1986; Kopin, et al. 1988; Heikkila, et al. 1989]. Dies sind alles Eigenschaften, die zusammen der Pathologie des M. Parkinson sehr nahe kommen und es bis heute zu einem der erfolgreichsten Parkinson-Tiermodelle für Forschungszwecke machen [Beal 2001].

In den Körper aufgenommenes MPTP wird über 2 Stufen in seinen Metaboliten MPP⁺ umgewandelt. Zuerst wird es in Astrozyten durch die MAO-B zu 1-Methyl-4-Phenyl-1,2-Dihydropyridiniumion (MPDP⁺) umgesetzt [Chiba, et al. 1984] und anschließend spontan zu 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridiniumion (MPP⁺) oxidiert [Markey, et al. 1984]. MAO-Inhibitoren wie z.B. Deprenyl und Pargyline verhindern die Bildung von MPP⁺ und wirken hierdurch protektiv auf Zellen [Mytilineou & Cohen

1984; Heikkila, et al. 1984a; Chiba, et al. 1984]. Das neu entstandene MPP^+ wird selektiv über den DAT, der essentiell für die Toxizität von MPP^+ zu sein scheint, in dopaminerge Neurone aufgenommen. Mit DAT-Inhibitoren (Mazindol) behandelte oder homozygote DAT (-/-) knock-out (KO) Mäuse erwiesen sich deutlich unempfindlicher gegenüber MPTP, als unbehandelte Mäuse bzw. Mäuse vom Wildtyp (WT) [Javitch, et al. 1985; Bezard, et al. 1999; Gainetdinov, et al. 1997].

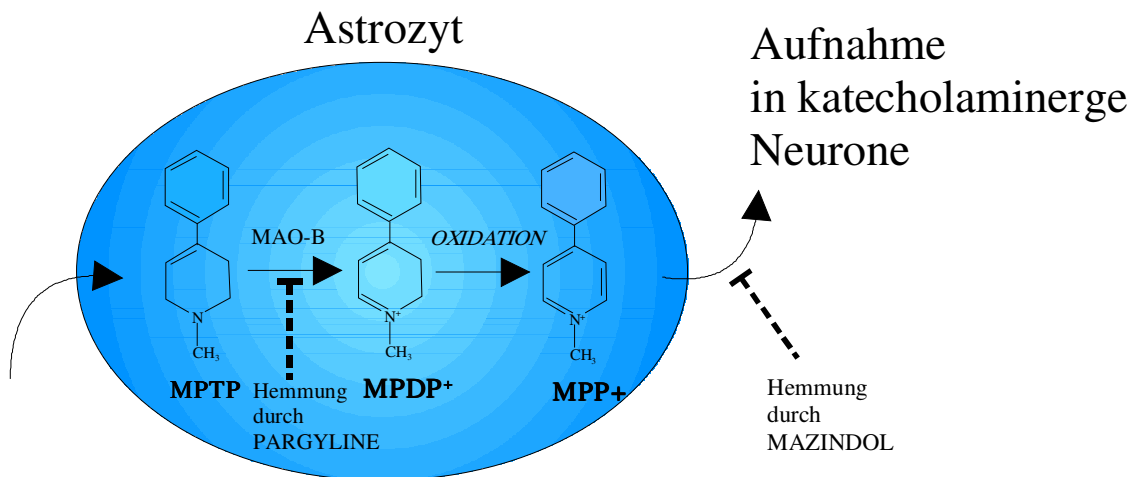


Abb.1.5: Aufnahme und Umwandlung von MPTP modifiziert nach [Javitch, et al. 1985].

Das aufgenommene MPP^+ wird in der Zelle über den VMAT2 in die Speichervesikel der Neurone gepumpt und senkt damit den zytoplasmatischen MPP^+ -Spiegel [Liu, et al. 1992]. So kann im Zytoplasma vorhandenes MPP^+ nicht in die Mitochondrien gelangen und diese schädigen [Singer, et al. 1987]. Da der VMAT2 eine wichtige Rolle in der Zellschädigung durch das MPP^+ spielt zeigten Versuche an heterozygoten VMAT2 (-/+) Mäusen, welche nach einer MPTP-Behandlung einen deutlich größeren Verlust an dopaminergen Neurone in der SN aufwiesen, als Mäuse vom WT VMAT2 (+/+) [Gainetdinov, et al. 1998; Takahashi, et al. 1997]. Interessanterweise greift MPTP selbst in diese Mechanismen ein, da es die Genexpression von DAT, VMAT2 vermindert und der für die Dopaminsynthese entscheidenden TH in der Zelle [Xu, et al. 2005].

1.4.1.2 MPTP-Toxizität

Trotz der intensiven Erforschung und mittlerweile umfangreichen Erkenntnissen über die MPTP-Toxizität ist der vollständige Mechanismus im Detail nicht geklärt.

In die Mitochondrien aufgenommenes MPP^+ bindet an Komplex I der Atmungskette und hemmt diese [Nicklas, et al. 1985; Beal 2003; Ramsay, et al. 1987], so dass alle ATP-abhängigen Vorgänge in der Zelle nicht mehr aufrecht erhalten werden können, was nach einiger Zeit unmittelbar zum Zelltod führt. Hierbei sind das für die Impulsweiterleitung wichtige Membranpotential, die Calciumhomöostase, der Transmitter-, der Ionen-transport und ATP-abhängige enzymatische Prozesse betroffen [Di Monte 1991; Cosi, et al. 1996]. Der Ionentransport und nicht-ATP-abhängige Enzyme werden noch indirekt durch die aus dem Gleichgewicht geratene Calciumhomöostase und den hohen intrazellulären Calciumspiegel gestört oder deaktiviert. Anders als das 6-OHDA, schädigt das MPTP vor allem im Anfangsstadium über die Hemmung der Atmungskette [Fonck & Baudry 2003].

Glutathione (GSH) ist ein wirksamer Radikalfänger. Es wird ATP-abhängig hergestellt [Desai, et al. 1996], wodurch sich bei Mangel das Gleichgewicht in Richtung zellschädigende freie Radikale verschiebt und die Zelle oxidativem Stress aussetzt. MPP^+ erniedrigt nicht nur die Radikalfängeraktivität, sondern erhöht die ROS-Konzentration indirekt über die Freisetzung von Dopamin in der Zelle. Durch Aufnahme in die Speichervesikel führt MPP^+ zu einer übermäßigen Dopaminfreisetzung und durch Herabsetzung der DAT-Aktivität zu einer Wiederaufnahmehemmung von Dopamin [Santiago, et al. 1991a; Santiago, et al. 1991b; Obata 2002]. Der Anstieg des intra- und extrazellulären Dopamins führt zur Auto-Oxidation des Dopamins und somit indirekt zu einem vermehrtem Anfall schädigenden Radikalen, wie z.B. dem Hydroxylion (OH^\cdot). Das Angiotensin Converting Enzym (ACE) ist durch Hemmung von Ca^{+} -abhängiger Dopaminausschüttung in der Lage, die Toxizität von MPP^+ zu schwächen [Obata 2002].

Über die Hemmung der Atmungskette durch MPP^+ entstehen Superoxidradikale ($O_2^{\cdot-}$) [Hasegawa, et al. 1990]. Mäuse, welche große Mengen des $O_2^{\cdot-}$ -Radikalfängers Superoxid-Dismutase produzierten und damit einen größeren Schutz vor dem $O_2^{\cdot-}$ -Radikal haben, waren unempfindlicher gegenüber MPTP [Przedborski, et al. 1992]. Allerdings spielen $O_2^{\cdot-}$ -Radikale aufgrund ihrer geringen Reaktionsfreudigkeit eine

Nebenrolle [Halliwell 1991]. $O_2^{\cdot-}$ -Radikale können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften nicht so leicht durch Membranen hindurch diffundieren und verbleiben deshalb an ihrem Entstehungsort.

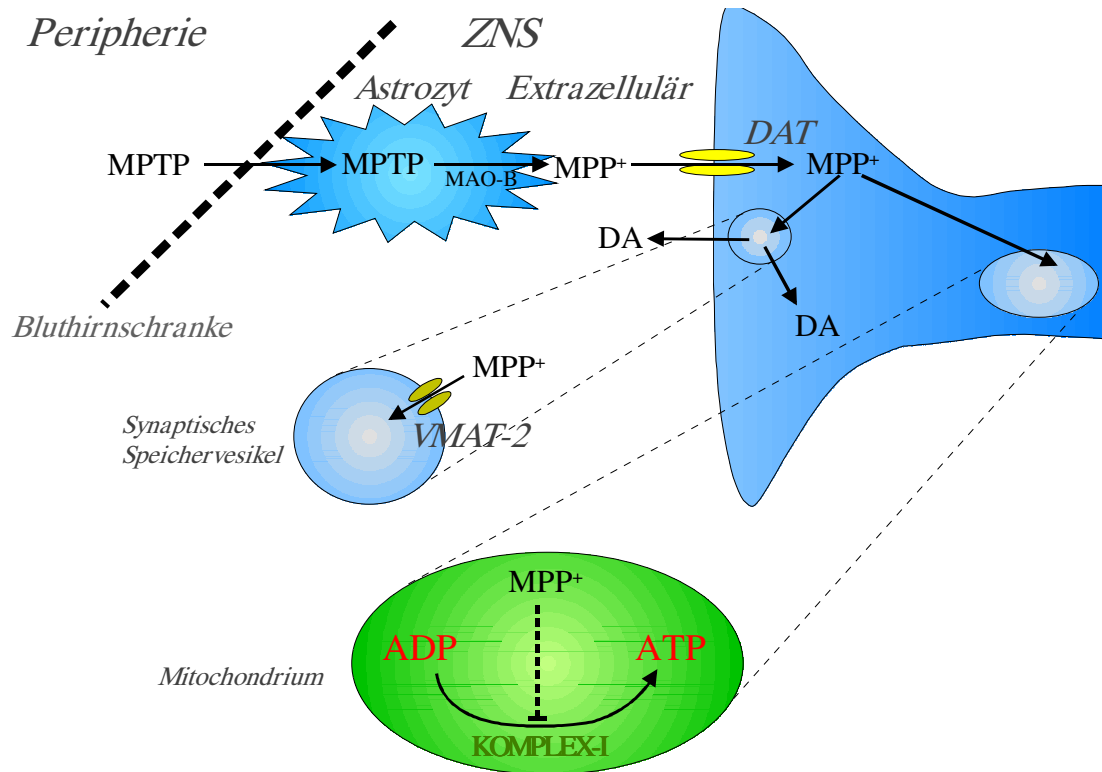


Abb.1.6: Schema zur MPTP-Toxizität (modifiziert nach Sian, et al..1999).

Ein weiteres Radikal ist das Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}). Es wird durch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthetase (nNOS) gebildet, ein Enzym, welches im ZNS in Neuronen, Astrozyten und der Mikroglia zu finden ist. NO^{\cdot} ist in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren und kann somit auch in benachbarte Neurone gelangen. NO^{\cdot} -Radikale reagieren mit $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen zu Peroxynitriten ($ONOO^{\cdot-}$), die sich unter physiologischem pH-Wert schnell zu den reaktionsfreudigen Hydroxylradikalen (OH^{\cdot}) zersetzen können [Beckman, et al. 1990]. Peroxynitrit besitzt auch selber stark oxidierende Eigenschaften und reagiert mit Proteinen, Lipiden und DNS der Zelle. Durch Oxidation von Proteinen und Lipiden werden diese inaktiviert. In der Folge kommt es in der DNS zu Strangbrüchen, wodurch die ATP-verbrauchende Poly(ADP-Ribose)-Synthetase (PARS; auch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) genannt) aktiviert wird [Szabo 1996; Kiss & Szabo 2005]. Hierdurch kommt es in der Zelle schnell zu einem Energiemangel und lebensnotwendige Prozesse können nicht mehr aufrecht erhalten werden [Przedborski, et al. 2000]. Übersteigt somit der

Peroxynitritspiegel die Radikalfängerkapazität einer Zelle, führt dies zur Störung der Zellhomöostase und damit zum Zelluntergang [Denicola & Radi 2005]. Peroxynitrit reagiert u.a. auch mit der Tyrosin-Hydroxylase (TH) und inaktiviert sie. Da die TH das Schlüsselenzym in der Dopaminsynthese ist [siehe Kap.1.3.1] fällt hierdurch der Dopaminspiegel ab.

Im Versuch zeigte sich, dass in nNOS-deletierten Mäusen oder durch Inhibition der NO-Radikal bildenden nNOS, die Bildung von Peroxynitriten und damit die MPTP-Toxizität abgeschwächt wird [Hantraye, et al. 1996; Przedborski, et al. 1996].

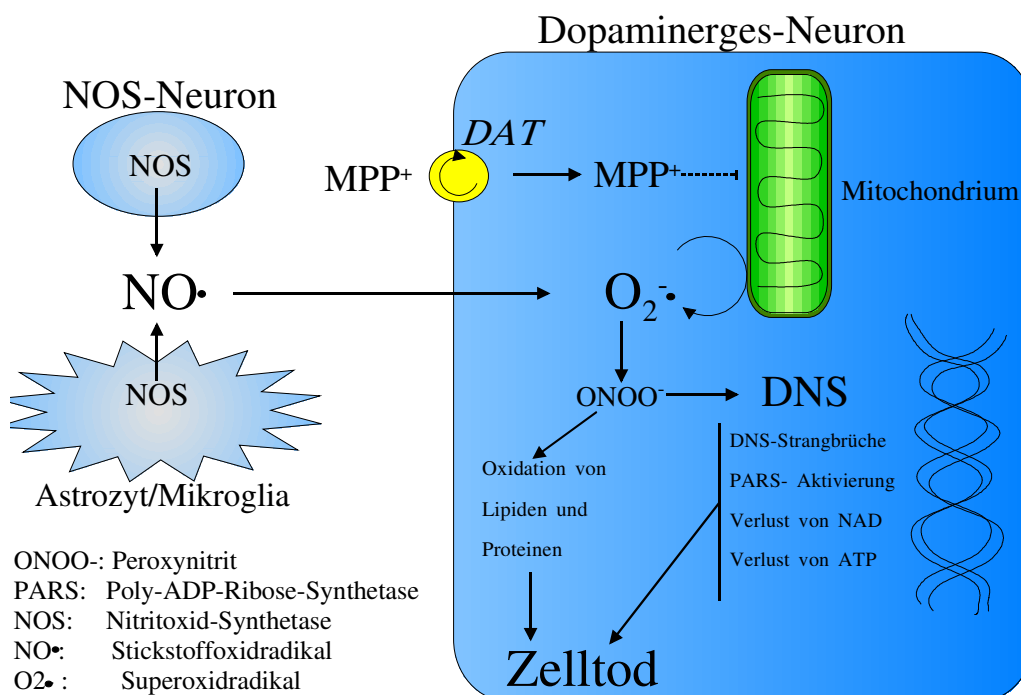


Abb.1.7: Radikalbildung bei MPTP modifiziert nach [Przedborski, et al. 1996].

O $_2\cdot^-$ kann durch das Schlüsselenzym NADPH-Oxidase in Immunzellen entstehen, v.a. in Zellen der Mikroglia. NADPH-Oxidase wird auch das ROS (reactive-oxygen-species) produzierende Enzym genannt, welches freie Radikale bei entzündlichen Reaktionen im Gehirn produziert. In MPTP behandelten Mäusen und an M. Parkinson erkrankten Personen konnte eine erhöhte Aktivität dieses Enzyms festgestellt werden [Wu, et al. 2003]. Desweiteren sind NADPH-Oxidase KO Mäuse, mit dem NADPH-Inhibitor Aponycin oder mit Dextromethorphan behandelte Mäuse signifikant resistenter gegenüber MPTP [Gao, et al. 2003; Zhang, et al. 2004]. So scheint das ROS-bildende Enzym NADPH-Oxidase ein wichtiges Enzym in entzündlichen

Reaktionen der Gliazellen zu sein, die nicht nur in MPTP-, sondern auch in Rotenon-, Annonacine-, Lipopolysaccharide-Tiermodellen und an M. Parkinson erkrankten Menschen durch toxische Substanzen zum Untergang dopaminerger Neurone führen können [Wu, et al. 2003; Hirsch, et al. 2005]. Über die Freisetzung von Zytokinen und freien Radikalen aktivieren die geschädigten dopaminergen Neurone die Gliazellen (v.a. Zellen der Mikroglia) [Zhang, et al. 2004]. Die aktivierten Zellen der Mikroglia setzen dann eine Vielzahl neurotoxischer Substanzen frei (Zytokine, Eicosanoide, $\text{NO}\cdot$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$), welche die Entzündungsreaktion in Gang setzen [Zhang, et al. 2004].

Durch die Gabe von Dexamethason ließ sich die durch MPTP ausgelösten Entzündungsreaktion abschwächen, an der Lymphozyten und Zellen der Mikroglia im Striatum und der SN beteiligt sind [Kurkowska-Jastrzebska, et al. 1999]. Auch durch Ausschaltung der Entzündungsmediatoren produzierenden Cyclooxygenase-2 (COX-2) in COX-2 KO Mäusen oder durch nicht-steroidale Antiphlogistika wird die Toxizität von MPTP abgeschwächt [Feng, et al. 2003; Hald & Lotharius 2005; Teismann & Ferger 2001].

1.4.1.3 Das MPTP-Modell in Anwendungen

Schon 12 h nach der letzten in 2 stündigen Abständen mit unterschiedlichen Dosen gesetzten intraperitonealen MPTP-Injektion lässt sich eine Degeneration dopaminerger Neurone feststellen, die bis zum 4. Tag anhält. Dabei kommt es anfangs zu einem reversiblen Verlust der TH-Immunreaktivität, was bei Anwendung dieser Färbemethode (TH-Färbung) zu falschen Ergebnissen führt [Jackson-Lewis, et al. 1995]. Bei einer Gesamtdosis von 150 mg/kg KG über 5 Tage lassen sich apoptotische Vorgänge im Zellkern feststellen [Tatton & Kish 1997]. Zu erwähnen ist noch die geringere Empfindlichkeit der dopaminergen Zellen in der VTA im Vergleich mit den Zellen der SNc [Varastet, et al. 1994].

Das MPTP-Parkinson-Modell wird heute hauptsächlich bei Mäusen und Primaten (Gold-Standard) verwendet. Ratten zeigen eine verminderte Sensitivität gegenüber MPTP [Giovanni, et al. 1994]. Ihre Resistenz ist bedingt durch eine hohe Aktivität der endothelialen MAO-B an der Bluthirnschranke. Dadurch wird bereits in der Peripherie MPTP in seinen geladene Metabolit MPP^+ umgewandelt, welcher nicht mehr in das Gehirn aufgenommen werden kann [Heikkila, et al. 1984a; Boyce, et al. 1984]. Bei diesen Tieren wird deshalb 6-OHDA eingesetzt oder MPP^+ direkt intrastriatal injiziert. Untersuchungen an Mäusen zeigten einen Unterschied in der MPTP-

Empfindlichkeit in Hinsicht auf Alter, Geschlecht und Mäusestamm. So reagieren weibliche, jüngere und kleinere Mäuse weniger sensibel, dagegen zeigten sich Mäuse mit C57/Bl6-Hintergrund deutlich sensibler als Mäuse anderer Stämme [Ali, et al. 1993; Miller, et al. 1998; Desai, et al. 1996].

Im Gegensatz zum 6-OHDA besitzt das MPTP lipophile Eigenschaften und kann somit peripher gespritzt werden. Weitere Bemerkungen zu den verschiedenen MPTP-Modellen (akut, subchronisch, chronisch) siehe [Kap. Material und Methoden]. Erwähnenswert ist, dass im akuten und subchronischen MPTP-Mausmodell keine Lewy-Körperchen oder Einschlusskörper gefunden wurden [Shimoji, et al. 2005].

1.4.2 6-OHDA

1.4.2.1 Das 6-OHDA-Parkinson-Modell

Bereits Ende der 60er Jahre wurde das Neurotoxin 6-OHDA entdeckt, nach dessen Applikation ins ZNS eine selektive Degeneration katecholaminerger Neurone beobachtet wurde [Ungerstedt 1968]. Es galt seither als relativ selektives katecholaminerges Neurotoxin. Das 6-OHDA besitzt im Vergleich zu Dopamin noch eine weitere Hydroxygruppe an seinem Phenyl-Ring, besitzt aber ähnliche biochemische Eigenschaften. Deshalb wird die Substanz in die SN, ins Striatum oder ins Mediale Vorderhirnbündel (MFB) injiziert, um damit die für 6-OHDA nicht passierbare Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und Nebenwirkungen durch Aufnahme in das periphere Nervensystem zu verhindern. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit den Katecholaminen kann es von der MAO abgebaut [Karoum, et al. 1993] und vom DAT in die Nervenzellen der dopaminergen Neurone aufgenommen werden [Sachs & Jonsson 1975; Luthman 1989].

An der Selektivität des Neurotoxins kamen jedoch aufgrund einiger in-vitro Studien Zweifel auf, da auch der Untergang nicht-dopaminergener Neurone beobachtet worden war [Michel und Hefti, 1990; Lotharius, et al. 1999] und das 6-OHDA auch in noradrenerge Neurone über den Norepinephrin-Transporter (NET) aufgenommen wird [Bove, et al. 2005]. Es scheint aber nicht unwahrscheinlich, dass diese Ergebnisse auf die experimentellen Bedingungen und der speziellen in-vitro Situation zurückzuführen sind. Andere Studien zeigen das auch in-vitro das 6-OHDA selektiv und dosisabhängig dopaminerge Neurone schädigt [Ding, et al. 2004, Beretta, et al. 2005] und dieser

destruktive Effekt von verschiedenen DAT-Inhibitoren verhindert werden kann [Ding, et al. 2004].

1.4.2.2 6-OHDA-Toxizität

6-OHDA kann aufgrund einer weiteren Hydroxygruppe noch leichter als Dopamin oxidieren und freie zytotoxische Radikale bilden, darunter Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxid- ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) [Cohen & Heikkila 1974], die u.a. Zellmembranen schädigen und so zum Zelluntergang führen können [Kumar, et al. 1995]. Normalerweise entstehen Radikale auch physiologisch durch Stoffwechselprozesse in der Zelle. Damit diese die Zelle

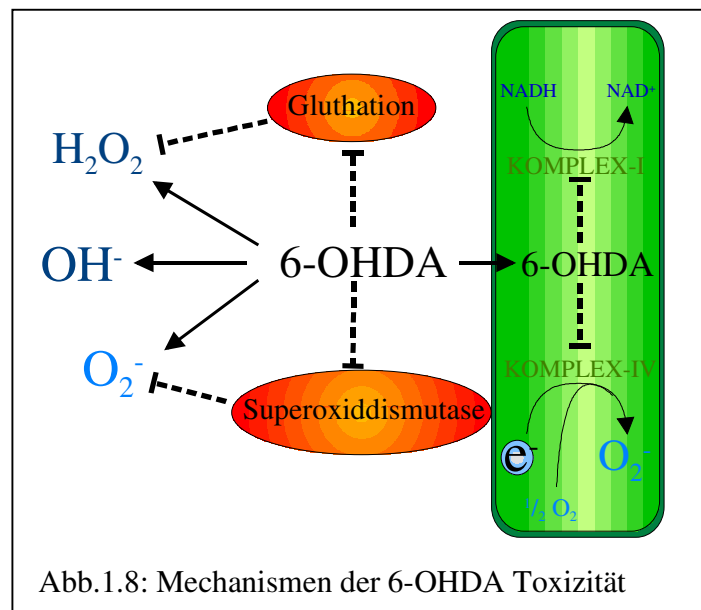


Abb.1.8: Mechanismen der 6-OHDA Toxizität

nicht zerstören besitzt die Zelle Radikalfänger (Gluthation, Superoxiddismutase), deren Aktivität aber durch 6-OHDA gesenkt wird [Sachs & Jonsson 1975]. In der 6-OHDA-Toxizität spielen die ROS eine große Rolle. Wie schon in Kap. 1.4.2.1 erwähnt, gab es in-vitro Studien, welche die selektive dopaminerge Neurotoxizität des 6-OHDA anzweifeln. Wie ebenfalls bereits in Kap 1.4.2.1 beschrieben, wird 6-OHDA über den DAT aufgenommen. In Studien wird allerdings eine DAT-unabhängige extrazelluläre Auto-Oxidation beschrieben [Hanrott, et al. 2006]. 6-OHDA wirkte dadurch in-vitro toxisch, obwohl der DAT inhibiert wurde [Hanrott, et al. 2006]. Wahrscheinlich kann man hier von einem in-vitro Artefakt ausgehen, da wie bereits in Kap. 1.4.2.1 erwähnt andere Studien die selektive dopaminerge Toxizität des 6-OHDA in-vitro beschreiben.

Dopaminerge Neurone sind für Radikale besonders anfällig, da anfallende Radikale aufgrund der hohen endogenen Radikalbildung in der Zelle schnell deren Radikalfängerkapazität übersteigen und somit u.a. das Dopamin, Lipide und Eisen leicht in zellschädigendem Ausmaß oxidieren können [Zhang, et al. 2004]. Zudem kommt noch die intrazelluläre Aufnahme des 6-OHDA und die damit verbundenen

Schäden, die 6-OHDA verursacht. So inhibiert 6-OHDA intrazellulär den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und IV (Cytochrome-C Oxidase) der Atmungskette und kann dadurch zum Zelltod führen [Glinka, et al. 1997]. Neben anderen ATP-abhängigen Funktionen wird auch der Calciumhaushalt der Zelle gestört und kann zum Zelluntergang beitragen. GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) [Sauer, et al. 1995] und eine Vorbehandlung mit Bromocriptin (ein Dopaminagonist) können intrastriatale Neurone vor 6-OHDA schützen [Ogawa 1994].

So kann man davon ausgehen, dass 6-OHDA vorwiegend selektiv dopaminerge Neurone zerstört, allerdings auch in der Lage ist, wie das MPP⁺, in hohen Konzentrationen andere Zellen über extrazelluläre Auto-Oxidation und den dadurch resultierenden oxidativen Stress zu schädigen [Cohen, 1984; Hanrott, 2006; Heikkila, 1971; Saner, 1971].

1.4.2.3 Das 6-OHDA-Modell in Anwendung

Wie bereits erwähnt, überwindet 6-OHDA genauso wie Dopamin nicht die Blut-Hirn-Schranke und muss deshalb ins Gehirn injiziert werden. Dabei sind zwei Modelle entwickelt worden, das akute und das subakute 6-OHDA-Modell. Im akuten Modell wird 6-OHDA direkt bilateral oder unilateral in die SNc oder ins mediale Vorderhirnbündel (MFB) gespritzt, bereits nach 12 h ist ein Untergang dopaminerger Neurone zu beobachten. Dabei kommt es zu einem nekrotischen und nicht zu einem apoptotischen Zelluntergang [Jeon, et al. 1995]. Bei der bilateralen Injektion sind deutliche motorische Defizite im Sinne eines Parkinson-Syndroms zu sehen. Dagegen sind bei der unilateralen Injektion die motorischen Störungen schwächer ausgeprägt. Durch die Zerstörung dopaminerger Neurone in der SNc kommt es durch den entstehenden Dopaminmangel zu einer „Up-Regulierung“ von Dopaminrezeptoren im Striatum. Diese können durch Verabreichung von Dopaminagonisten (Apomorphin) oder dopaminfreisetzenden Stoffen (Amphetamin) stimuliert und dann durch einen Rotationstest das Ausmaß des Zellverlustes untersucht werden [Ungerstedt 1971; Jones, et al. 1996]. Da beim akuten 6-OHDA-Modell der Zelluntergang sehr schnell voranschreitet, treten hier motorische Defizite rasch auf. Damit eröffnen sich Möglichkeiten der Erforschung neuer pharmakologischer Substanzen [Beal 2001].

Im subakuten 6-OHDA-Modell wird 6-OHDA ins Striatum injiziert. Das Modell kommt dem M. Parkinson in seinem Verlauf näher. Hier fallen die motorischen Defizite allerdings schwächer aus. Versuche ergaben, dass eine einmalige intrastriatale

Injektion von 6-OHDA erst nach etwa 1-2 Wochen zu einem mit Verzögerung eintretenden progressiven retrograden Zelluntergang dopaminerger Neurone führt, die in das Striatum projizieren. Dieser Prozess war auch noch 16 Wochen nach der Injektion zu beobachten [Sauer & Oertel 1994]. Heute wird 6-OHDA v.a. beim Parkinson-Ratten-Modell verwendet. Das unilaterale 6-OHDA-Ratten-Modell ist nach wie vor eines der am häufigsten angewendeten Modelle in der Erforschung neuer symptomatischer Therapien, neuroprotektiver Strategien und Transplantationstechniken [Bove, et al. 2005].

1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

1.5.1 Funktionen des UPS

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert in der Zelle Proteine, die von ihrer ursprünglichen Form und Funktion abweichen [Giasson & Lee 2003]. Eine Störung in diesem System führt letztendlich durch Proteinhäufungen in der Zelle zum Zelltod [McNaught, et al. 2003]. In-vitro führt die Hemmung des UPS zu α -Synuclein (α -Syn)- und Ubiquitin-positiven Einschlusskörperchen und einem Verlust dopaminerger Neurone [Rideout, et al. 2001]. Störungen im UPS führen somit zu α -Syn Aggregatbildungen [siehe Kap.1.6.5.6] die auch in neurodegenerativen Erkrankungen zu finden sind [Recchia, et al. 2004].

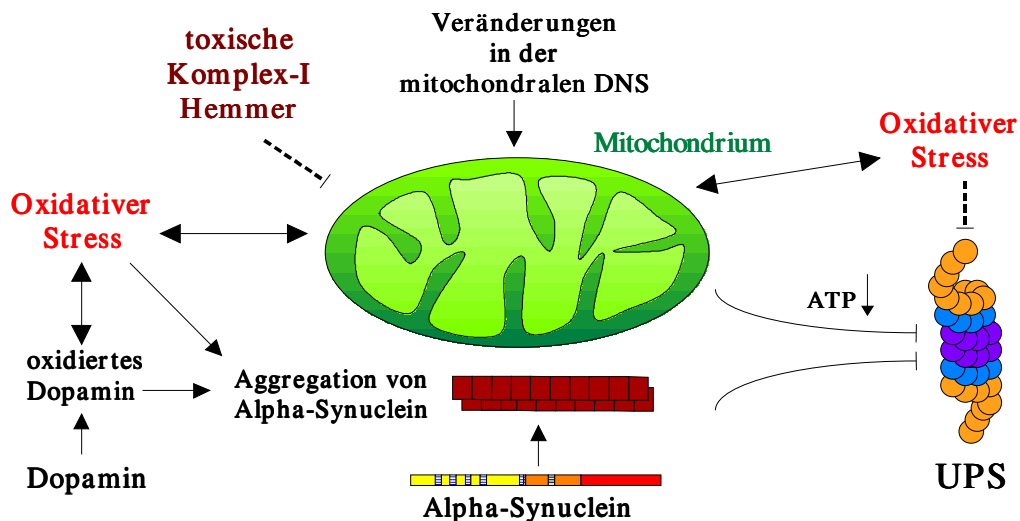


Abb.1.9: Hemmende Einflüsse auf das UPS modifiziert nach [Moore,West, et al. 2005].

1.5.2 Der UPS-Kreislauf

Ubiquitin (Ub) Monomere werden von Ub-aktivierenden Enzymen (E1) ATP-abhängig aktiviert und dann von einem Ub-konjugierenden Enzym (E2), auch Ubiquitin-Träger-Protein genannt, übernommen. E2 interagiert auf verschiedene Weise mit Ub-Protein-Ligasen (E3 z.B. Parkin) und überführt das aktivierte Ub an E3, welches für die Anheftung von Ub an seine Zielproteinen sorgt und in der Lage ist normale von abnormale Proteinen zu unterscheiden. Ub-Monomere besitzen einen Lysin-Akzeptor-Rest an dem sich ein weiteres Ub-Monomer anheften kann und sich dadurch Poly-Ub-Ketten bilden. ATP-abhängig werden durch ein K29- oder K48-Signal die Zielproteine von den Poly-Ub-Ketten mit dem 26S Proteasom verbunden. Das 26S Proteasom gehört zur Familie der multikatalytischen Proteasen und findet sich im Zytoplasma, endoplasmatischen Retikulum, perinukleär und im Kern von eukaryotischen Zellen [Voges, et al. 1999]. Durch Ubiquitin markierte Proteine werden von ihm in viele kleine Peptide zerlegt und anschließend in kleine Peptidfragmente überführt. Die Ub-Ketten werden durch deubiquitinierende Enzyme (z.B. UCH-L1) in freie Ub-Monomere zerlegt und wiederverwendet. Sowohl durch die einfache oder mehrfache Anbindung von Ub-Monomere, als auch durch Anbindung von Ub-Ketten in Verbindung mit K63 werden auch andere nicht-proteasomale Funktionen ausgeführt. Hierzu gehören überlebenswichtige Zellprozesse wie z.B. Zellzyklus, -teilung, -differenzierung, -entwicklung, Reparaturen der DNS, Endozytose, Regulation der Proteintranskription, Biogenese der Zellorganellen um nur einige zu nennen.

Mehre Faktoren können das UPS hemmen. Bekannte Ursachen hierfür sind oxidativer Stress, ATP-Mangel, α -Syn-Aggregate und „feed-forward“ Mechanismen [Glickman & Ciechanover 2002] .

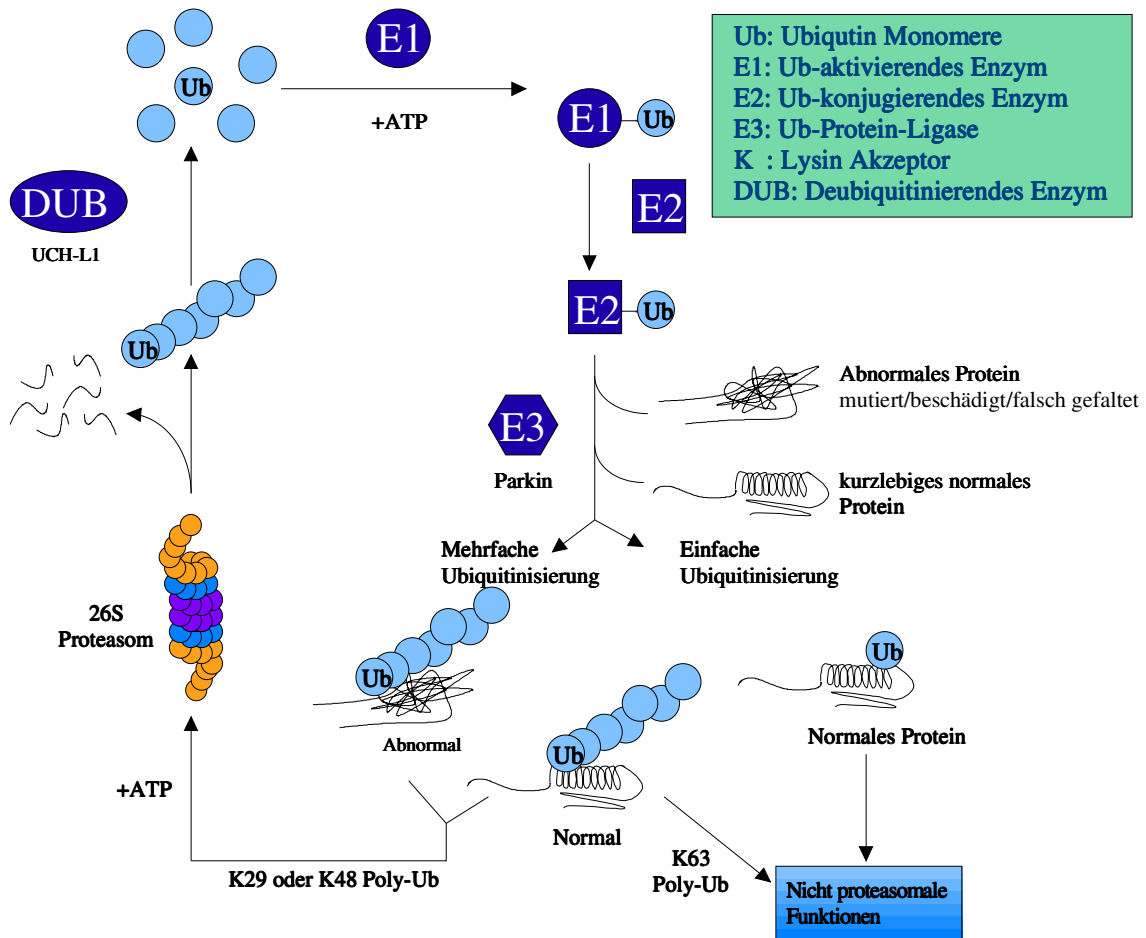


Abb.1.10: Kreislauf des UPS modifiziert nach [Moore, et al. 2005].

1.6 α -Synuclein (α -Syn)

1.6.1 Entdeckung des α -Syn

Dieses Protein zog die Aufmerksamkeit der Parkinsonforschung auf sich, als man bei autosomal-dominant vererbaren M. Parkinson eine Mutation im α -Syn Gen (Park1) entdeckte. Die mutierten Proteine unterschieden sich jeweils in einer AS auf Position 30 (Ala-30-Pro (A30P)) und auf Position 53 (Ala-53-Thr (A53T)) von ihrem Original [Polymeropoulos, et al. 1997; Kruger, et al. 1998].

1993 fand man das α -Syn bei der Untersuchung von Amyloid-Ablagerungen des M. Alzheimer, als man neben dem schon bekannten Hauptbestandteil beta/A4-Proteinfragment noch auf zwei weitere bisher unbekannte Peptide stieß. Das eine aus mindestens 35-AS bestehende hydrophobe Peptid bekam den Namen NAC (non-A-beta-component des M. Alzheimer Amyloids) und sein aus 140 AS bestehender Vorläufer den Namen NACP [Ueda, et al. 1993; Jakes, et al. 1994]. Das α -Syn entspricht dem NACP (non-A-beta-component-precursor des M. Alzheimer Amyloids). Als dann das α -Syn dann nicht nur in den Amyloid-Ablagerungen von M. Alzheimer Patienten, sondern auch in den Oligodendrozyten bei Multipler Systematrophie (MSA) und in Neurone bei M. Parkinson (hier Lewy-Körperchen) gefunden wurde [Spillantini, et al. 1997], gelangte das α -Syn endgültig ins Fadenkreuz der Forschung. Schließlich formte man einen neuen Begriff unter dem man diese und weitere Krankheiten, zu den „Synucleinopathien“ zusammenfasste [Spillantini & Goedert 2000].

Synucleinopathien

M. Parkinson

Demenz mit Lewy-Körperchen, M. Alzheimer, Down-Syndrom

MSA, Shy-Drager Syndrome, Striatonigrale Degeneration, Olivopontocerebellae Atrophie
Hallervorden-Spatz, Neuroaxonale Dystrophy

Traumatische Hirnschädigung mit Syn-positiven Läsionen

Amyotrophe Lateralsklerose, Niemann-Pick-Krankheit

Abb.1.11: Zusammenfassung modifiziert aus [Recchia, et al. 2004].

1.6.2 Proteinstruktur des α -Syn

Die Primärstruktur dieses Proteins besteht aus 140 AS und müsste Berechnungen zur Folge eine molekulare Masse von etwa 14 kDA haben. Untersuchungen lassen eher auf eine molekulare Masse von 19-20 kDa schließen und legen die Vermutung nahe, dass posttranskriptional eine Modifikation stattfindet [Jakes, et al. 1994].

α -Syn liegt in Lösung ungefaltet vor und seine Struktur erlaubt dem Protein, abhängig von seiner Umgebung, unterschiedliche Konformationen anzunehmen [Weinreb, et al. 1996]. In seiner Struktur und Funktion kann es in drei Abschnitte unterteilt werden. Der erste Abschnitt (1-64), der N-terminale Teil, bildet in Gegenwart von Phospholipiden eine α -Helix Struktur aus und kann damit auch an diese anbinden

(vorwiegend negativ geladene) [George, et al. 1995; Davidson, et al. 1998]. Er enthält außerdem einen in seiner Funktion noch unklaren, aus 11 AS bestehenden Abschnitt mit verschiedenen Varianten der KTKEGV-Sequenz, der sich innerhalb des Proteins sechs mal wiederholt [Lavedan 1998].

Der zweite Abschnitt (65-94) ist das 35 AS lange, hydrophobe NAC, der das sogenannte „GAV“-Motiv enthält. Dieses „GAV“-Motiv ist eine AS-Sequenz, die für die Aggregation und Bildung von A β -ähnlichen Protofibrillen des α -Syn verantwortlich ist [Du, et al. 2003; El Agnaf & Irvine 2002]. Die gebildeten Protofibrillen mit β -Faltblattstruktur sind wasserlöslich [Conway, et al. 2001] und können sich zu unlöslichen Fibrillen vereinigen, die sich dann zu den Lewy-Körperchen anhäufen können [Conway, et al. 2001; Goedert, et al. 1998; Narhi, et al. 1999] [siehe Kap.1.5.5.6].

Der letzte Abschnitt ist ein stark negativ geladenes Carboxyendteil. Das Carboxyende besteht vorwiegend aus dem sauren AS Glutamat und Aspartat und zeigt zwischen den einzelnen Tierarten die größte Variationsbreite. Es hält das Protein in Lösung [George 2002] und hier finden sich auch die meisten Stellen für eine Phosphorylisation des Proteins [Recchia, et al. 2004].

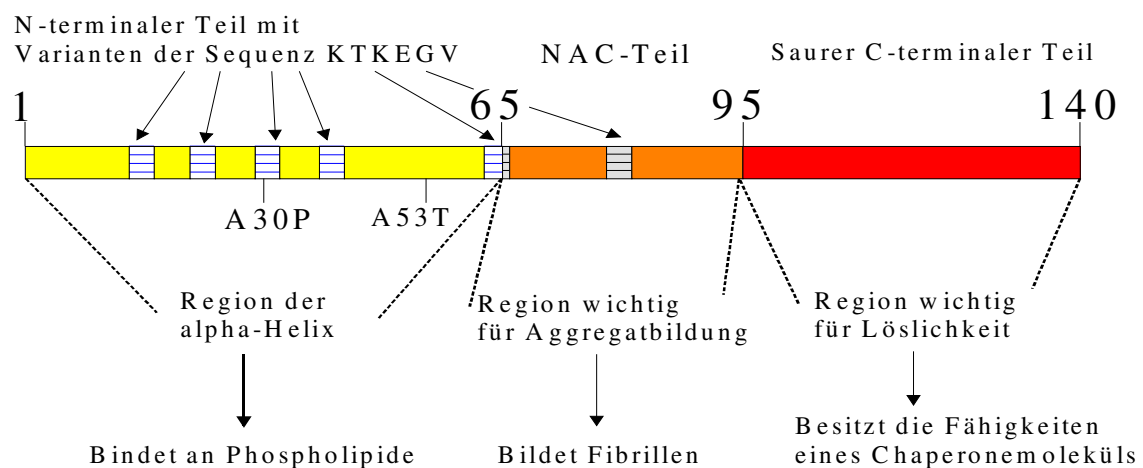


Abb.1.12: Das menschliche α -Syn Protein modifiziert nach [Recchia, et al. 2004].

Alle α -Syn Proteine besitzen die gleiche Anfangssequenz von 42 AS. Das α -Syn des Menschen unterscheidet sich von dem der Maus in 7 AS. Die AS Threonin liegt bei

der Maus interessanterweise auch auf Position 53, an der Stelle liegt beim autosomal-dominant vererbaren M.Parkinson des Menschen auch eine Mutation vor (Ala-53-Thr) [Polymeropoulos, et al. 1997]. Das α -Syn der Maus unterscheidet sich in einer AS von dem der Ratte [George 2002]. In Wirbeltieren liegt die Erbinformation für die Syn-Proteine auf drei Genen codiert. Das α -Syn Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 4q21.3-q22 [Chen, et al. 1995].

1.6.3 Die Synuclein-Familie

Inzwischen wurden neben dem α -Syn auch das β -Syn und das γ -Syn der „Synuclein-Familie“ isoliert. Strukturell sind alle Synucleine ähnlich aufgebaut. Das β -Syn, dessen Erbinformation auf dem Chromosom 5q35 liegt, ist ein 134 AS langes Phosphoprotein und wurde zuerst aus Rinderhirnen isoliert [Jakes, et al. 1994; Spillantini, et al. 1995]. Das γ -Syn, bei Mäusen und Hühnern auch „Persyn“ genannt, ist 127 AS lang und liegt auf dem Chromosom 10q23.2-q23.3 [Ninkina, et al. 1998]. Es findet sich im Gegensatz zum α - und β -Syn weniger in den synaptischen Nervenendigungen des ZNS, sondern vor allem im peripheren Nervensystem (in Zellkörpern und Axonen von Neuronen der Motorik, des Sympathischen Nervensystems und der Retina) [George 2002; Ji, et al. 1997], im Riechepithel, in Ovarialtumoren und in Zellen des invasiven Mamma-Karzinoms [Lavedan, et al. 1998; Duda, et al. 1999; Buchman, et al. 1998], wo das Ausmaß der Expression von γ -Syn mit der Schwere und dem weiteren Verlauf der Krankheit korreliert [Clayton & George 1998; Ji, et al. 1997]. Im Unterschied zum α -Syn bilden das β - und γ -Syn keine Amyloid-ähnliche Fibrillen, sondern hindern das α -Syn an dessen Ausbildung [Uversky & Fink 2002; Uversky, et al. 2002]. Soweit bisher bekannt, spielen sie auch keine Rolle bei vererbbaaren Erkrankungen des ZNS [Goedert 2001]. Untersuchungen lassen allerdings deren Beteiligung in neurologischen Erkrankungen vermuten [Galvin, et al. 1999].

1.6.4 Vorkommen im Menschen

Synucleine kommen wie erwähnt in Wirbeltieren v.a. im ZNS vor. Alle drei sind in den Nervenendigungen der Neurone reichhaltig vorhanden [Maroteaux, et al. 1988; Iwai, et al. 1995], v.a. im Neokortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus, Cerebellum [Nakajo, et al. 1994; Iwai, et al. 1995].

Im menschlichen Gehirn wird α -Syn am stärksten in der SN, sowie im Hippocampus, Nucleus caudatus und Corpus amygdaloideum exprimiert. Geringere Expression findet

sich in Thalamus und Corpus callosum, noch weniger im Nucleus subthalamicus [Lavedan 1998]. Außerhalb des ZNS kommt α -Syn v.a. in Skelett- und Herzmuskel vor. Geringere Expression findet in Pankreas, Nieren, Lunge und Plazenta statt [Ueda, et al. 1993; Ueda, et al. 1994].

Im ZNS ist das α -Syn v.a. in der Nähe von synaptischen Speichervesikeln zu finden, ohne an diese gebunden zu sein [Iwai, et al. 1995]. Bei MSA und M. Parkinson lagert sich das α -Syn in den Lewy-Neuriten (dystrophische Neuriten) ab [Spillantini, et al. 1998]. Es ist auch der Hauptbestandteil des eosinophilen Kerns der Lewy-Körperchen [Spillantini, et al. 1997; Spillantini, et al. 1998]- im Gegensatz zum β - und γ -Syn, die nicht in Lewy-Körperchen vorkommen [Spillantini, et al. 1998]. Die unlöslichen Lewy-Körperchen sind im Durchmesser 5-25 μ m große, sphärische, hyaline, fibrilläre Einschlüsse im Zytoplasma mit einem dichten eosinophilen Kern und einem blassen Rand, dessen Hauptbestandteil Ubiquitin ist [Spillantini, et al. 1997]. Ob sie pathogen sind, ist noch nicht geklärt, aber ihre Anzahl im Cortex korreliert mit dem Demenzgrad der Erkrankung. Sie sind wahrscheinlich eher nicht pathogen, sondern vielmehr Ablagerungen pathogener Strukturen [siehe Kap.1.5.5.6] und zudem immer in Gehirnen von an M. Parkinson erkrankten Personen zu finden, allerdings sind sie nicht spezifisch für den M. Parkinson [Gibb & Lees 1989; Takahashi & Wakabayashi 2005]. Wie schon erwähnt wurde kommen sie auch bei anderen neurologischen Erkrankungen vor, u.a. M. Alzheimer, Multipler Systematrophie (MSA) [Spillantini, et al. 1998; Spillantini & Goedert 2000]. Sowohl mutiertes α -Syn beim vererbbaaren, als auch α -Syn vom Wildtyp beim nicht-vererbbaaren M. Parkinson konnte in den Lewy-Körperchen gefunden werden [Mezey, et al. 1998]. α -Syn findet sich in den zytoplasmatischen Einschlüssen der Gliazellen bei der MSA und der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), nicht dagegen beim M. Pick und der Multi-Infarkt-Demenz [Mezey, et al. 1998], was darauf schließen lässt, dass eine Degeneration des ZNS nicht zwangsläufig eine Ablagerung von α -Syn zur Folge hat.

Beobachtungen zufolge scheint sich im Laufe der Gehirnentwicklung das α -Syn anfangs vom Zellkörper zu den terminalen Nervenendigungen umzuverteilen und in der Entwicklung des Gehirns stärker exprimiert zu werden [Petersen, et al. 1999; Hsu, et al. 1998]. α -Syn würde somit eine Rolle in der Entwicklung und Ausbildung des Gehirns spielen [Lavedan 1998; George 2002; Petersen, et al. 1999; Stephan, et al. 2002]. Allerdings fand man bei α -Syn (-/-) KO Mäusen einen normalen Hirnaufbau [Abeliovich, et al. 2000]. Interessanterweise ist noch zu erwähnen, dass α -Syn eine

Funktion in Lernvorgängen einnimmt. So konnte während der Lernphase eines Liedes, eine deutlicher Zunahme des Proteingehaltes in Gehirnen von Singvögeln festgestellt werden [George, et al. 1995].

1.6.5 Physiologie

Es hat sich gezeigt, dass das α -Syn an einer Vielzahl von Vorgängen in der Zelle teilnimmt. Zu den wichtigsten gehören der Einfluß auf präsynaptische Vesikel, Protein- und Enzymfunktionen sowie den Dopaminstoffwechsel und den axonalen Transport. Trotz dieser Erkenntnisse im Einzelnen ist die Funktion und Rolle, die das Protein im Gehirn und Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen spielt, nach wie vor noch unklar.

1.6.5.1 α -Syn als Chaperonprotein

Das α -Syn ähnelt in seinen biochemischen Eigenschaften denen eines Chaperoneproteins [George 2002]. Chaperone sind Proteine, die an der Faltung und am Transport anderer Proteine beteiligt sind. Sie können dabei die Fehlfaltung eines Proteins und die irreversible Verklumpung ungefalteter Proteinketten verhindern [Hartl & Hayer-Hartl 2002]. So verhindert eine erhöhte Produktion von Chaperoneproteinen in Chorea Huntington Zellkulturmodellen die Ablagerung von schädlichen Proteinaggregaten [Sittler et al. 2001].

Beim mutierten α -Syn könnte diese Eigenschaft eines Chaperoneproteins fehlen und somit zur Ablagerung von Proteinen, z.B. in Lewy-Lörperchen, führen [George 2002]. Das α -Syn und das 14-3-3 Protein, eines der vielen im Zytoplasma vorkommenden Chaperonmoleküle, besitzen zu 40 % die gleiche Struktur und ähnliche funktionelle und physiologische Eigenschaften [Ostrerova, et al. 1999]. In vielen Funktionen scheint das α -Syn allerdings ein Antagonist des 14-3-3 Proteins zu sein.

1.6.5.2 α -Syn als Regulator von Proteinen

α -Syn bindet und hemmt im Gegensatz zu 14-3-3 die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPkinase), die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) und die Proteinkinase C (PKC), Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinasen und dephosphoryliert und aktiviert BAD [Zha, et al. 1996; Iwata, et al. 2001; Iwata, et al. 2001; Okochi, et al. 2000; Lee, et al. 2002]. BAD ist ein Bcl-2 Homolog, das durch Bcl-2 Hemmung zum apoptotischen Zelltod führt [Yang, et al. 1995]. Das α -Syn kann auch direkt an 14-3-3 binden, dass

dann durch die Komplexbildung nicht mehr BAD phosphorylisieren und hemmen kann [Ostrerova, et al. 1999].

Die Regulierung von Enzymaktivitäten oder Proteinfunktionen durch das α -Syn werden wahrscheinlich durch Phosphorylierungsprozesse kontrolliert [Okochi, et al. 2000; Ellis, et al. 2001; Nakamura, et al. 2002], da phosphoryliertes α -Syn die Phospholipase D2 (PLD2)-Aktivität schwächer hemmt [Pronin, et al. 2000].

1.6.5.3 Funktionen im Dopaminstoffwechsel

Wie auch das 14-3-3 Protein bindet das WT- α -Syn als auch das A30P und A53T α -Syn in seiner löslichen Form an die TH. Im Gegensatz zum 14-3-3 Protein senkt es dessen Aktivität und damit die Dopaminproduktion [Perez, et al. 2002]. Auch eine Senkung durch Abnahme der Genexpression der TH ist beobachtet worden [Yu, et al. 2004]. Durch Hemmung der TH-Aktivität nimmt damit das α -Syn einen hemmenden Einfluß auf die Dopaminproduktion [Perez, et al. 2002].

1.6.5.4 α -Syn als präsynaptischer Regulator

Das α -Syn ist auch ein präsynaptischer Regulator, der hemmenden Einfluß auf die Dopaminausschüttung hat. An α -Syn KO Mäusen konnte, ausgelöst durch elektrische Stimulation, ein vermehrter Dopaminausstoß in den nigrostriatalen Endigungen nachgewiesen werden [Abeliovich, et al. 2000]. Zudem wurde auch ein Einfluß auf die präsynaptischen Vesikel festgestellt. α -Syn KO Zellkulturen (gezüchtete und durch immunreaktive Entfernung des α -Syn erzeugte) hatten deutlich geringere Konzentrationen an präsynaptischen Vesikel und füllten diese bei Verbrauch auch langsamer wieder auf [Cabin, et al. 2002; Murphy, et al. 2000]. Auch in seiner Protofibrillenform kann α -Syn zur Entleerung der Speichervesikel ins Zytoplasma und damit zu einem Dopaminanstieg im Zytoplasma führen [siehe Kap.1.5.5.6]. Allerdings scheint hier eine genetische Komponente eine Rolle zu spielen. So zeigten α -Syn KO Mäuse der Kreuzung von 129SV/j x C57/B16 F2 Stämmen eine Dopaminreduktion im Striatum [Abeliovich, et al. 2000], wohingegen reine C57/B16 α -Syn KO Mäuse keinen Verlust an striatalem Dopamin aufwiesen [Robertson, et al. 2004].

Das Protein Calmodulin (CaM) interagiert Ca^{2+} -abhängig mit α -Syn, wodurch an der Präsynapse, durch Ca^{2+} -Konzentrationsveränderungen über CaM vermittelt, Einfluß auf die Funktionen des α -Syn genommen werden kann [Martinez, et al. 2003]. Ein weiteres Protein, an welches α - (und β -) Syn bindet und inhibiert ist das Enzym

Phospholipase D2 (PLD2) und in geringerem Maße die Phospholipase D1 (PLD1) [Jenco, et al. 1998; Ahn, et al. 2002]. Die PLD2 ist ein transmembranäres Enzym des Golgi-Apparates und der Plasmamembran, das auch im Zellkern und im Zytoplasma zu finden ist. Die PLD2 hydrolysiert Phospholipide wie das Phosphatidylcholin in „phosphatitic-acid“, das wiederum bei der Freisetzung von Speichervesikeln aus dem Golgi-Apparat eine Rolle spielt [Freyberg, et al. 2002; Liscovitch, et al. 2000]. Auch im „Recycling“ von Vesikeln scheint die PLD2 beteiligt zu sein. Damit könnte α -Syn durch Regulation der PLD2-Funktion einen Einfluß auf die Freisetzung und auf das „Recycling“ von Vesikeln haben [Lotharius & Brundin 2002]. Einen Einfluss auf das „Recycling“ von Vesikeln könnte das α -Syn auch über seine Eigenschaft der Fettsäurebindung nehmen [Perrin, et al. 2001], da mehrfach ungesättigte Fettsäuren an Endozytosevorgängen der Vesikel beteiligt sind [Heuser & Reese 1973; Schmidt, et al. 1999]. Auch der axonale Transport der Vesikel von den Endosomen zur Präsynapse scheint von α -Syn durch Proteinbindungen beeinflusst zu werden [Lucking & Brice 2000].

α -Syn nimmt über seine Proteinbindungsfähigkeit auch Einfluss auf die Dopaminkonzentration im Zytosol. Die DAT-Aufnahmekapazität wird durch kinasenabhängige „second-messenger“ Systeme gesteuert [Pristupa, et al. 1998; Daniels & Amara 1999]. Durch die MAPkinasen ERK1 und 2 wird mehr DAT aus dem Zytosol in die Plasmamembran eingebaut was eine steigende Dopaminaufnahme zur Folge hat [Moron, et al. 2003]. An diese MAPkinasen kann das α -Syn binden und sie damit inhibieren [Iwata, et al. 2001]. Auch durch direkte Protein-Protein Verbindung von α -Syn WT und A30P kann die Aktivität des DAT gesenkt werden [Wersinger & Sidhu 2003]. Diese Entdeckung wird teilweise kontrovers diskutiert, da gemäß anderen Studien das α -Syn durch direkte Bindung an den DAT die DA-Aufnahme beschleunigt [Lee, et al. 2001] und in α -Syn KO Mäusen die DAT-Aktivität keine Veränderungen zeigte [Dauer, et al. 2002]. Einer DAT-Hemmung entgegen durch Anstieg des zytosolischen Dopamins wirkt mutiertes A53T α -Syn, welches die Dopaminaufnahme in die Vesikel durch Herunterregulierung des VMAT2 senkt [Lotharius, et al. 2002].

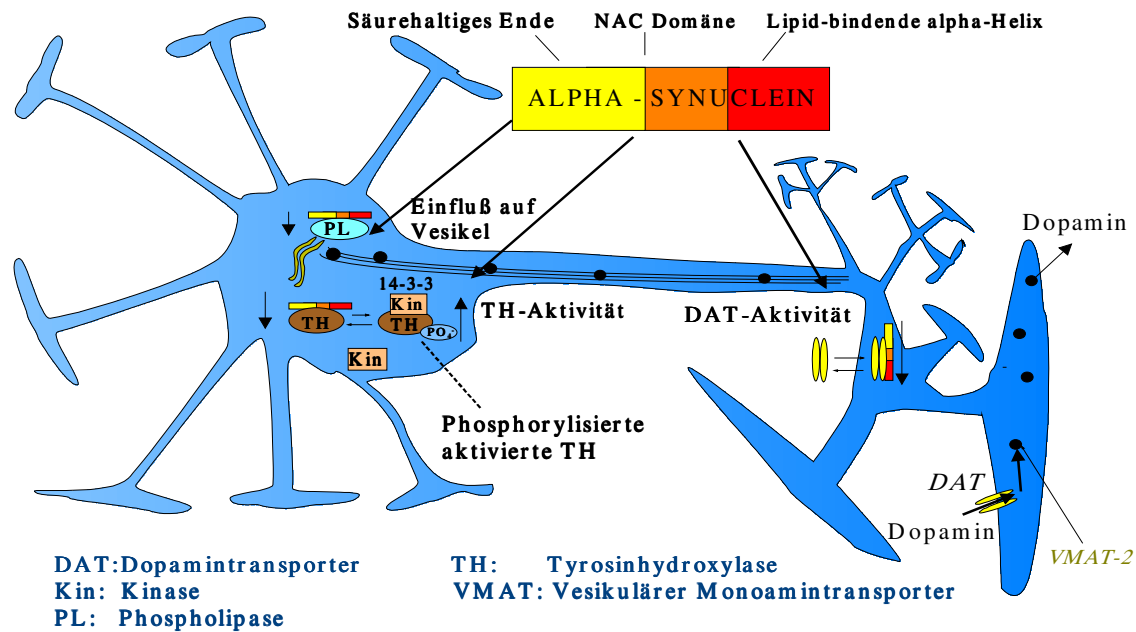


Abb.1.13: Einfluß von α -Syn auf den Dopaminstoffwechsel modifiziert nach [Sidhu, et al. 2004]

1.6.5.5 α -Syn und Dopamin

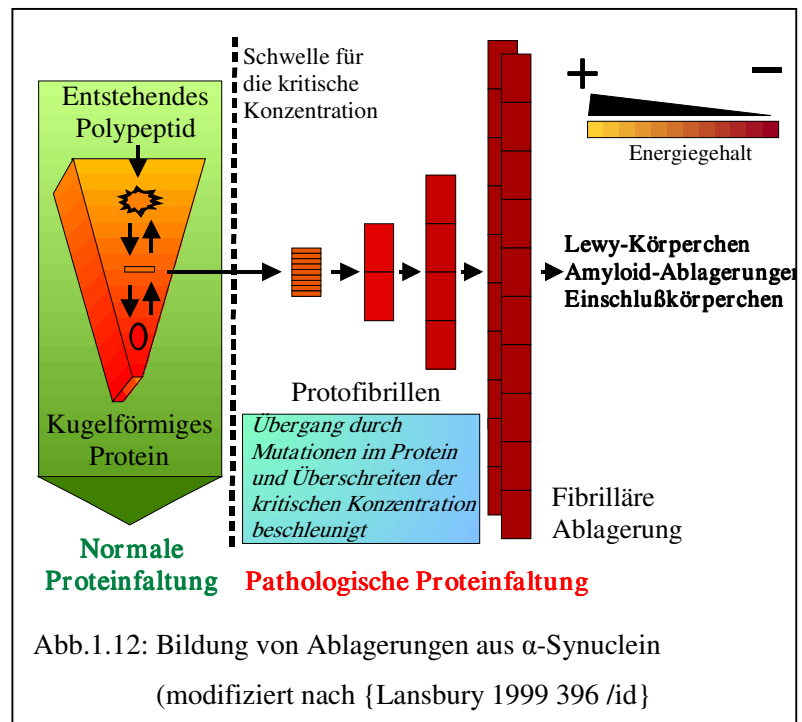
Die Folge der verminderten Bioverfügbarkeit von löslichen α -Syn ist ein Ungleichgewicht in der Funktion vieler Kinasen bis hin zu einem zellschädigenden Ausmaß. Vor allem führt ein α -Syn Mangel zu einem vermehrten Anfall von Dopamin im Zytoplasma, da DAT- und TH-Aktivität erhöht und die VMAT2 Aktivität erniedrigt ist [Sidhu, et al. 2004]. Dadurch könnte α -Syn zytoprotektiv wirken, da über DA vermittelter oxidativer Stress reduziert werden würde [Wersinger, et al. 2003]. So spielt das Dopamin (DA) im Zusammenhang mit dem α -Syn eine wichtige Rolle. Denn obwohl sich α -Syn in allen (auch nicht-dopaminergen) Hirnregionen finden lässt und insgesamt 0,1 % aller im Gehirn exprimierten Proteine ausmacht [Clayton & George 1998; Lavedan 1998], führen lösliche α -Syn Proteinkomplexe in-vitro zu einem selektiven Untergang dopaminergener Neurone [Xu, et al. 2002].

Eine schon erwähnte Eigenschaft des Dopamins ist die Radikalbildung [siehe Kap.1.3.4]. Durch oxidativen Stress, der v.a. in dopaminergen Neuronen auftritt, wird die Bildung von Aggregaten des α -Syn begünstigt, wobei es in der Zelle zur verminderten Bioverfügbarkeit von löslichem α -Syn kommt [Hashimoto, et al. 1999]. Auch die Reaktion mit Radikalen kann die Bioverfügbarkeit des α -Syn senken, indem z.B. das hochreaktive Peroxynitrit das α -Syn durch Nitration verändert [Przedborski, et

al. 2001]. Hinzu kommt, dass gerade die dopaminergen Neurone der SN reichhaltig an freiem Eisen sind [Sofic, et al. 1988] und so zusätzlich durch die Fenton-Reaktion beim Dopaminabbau über die MAO-B entstandenes H_2O_2 in das hochreaktive OH^\bullet umgewandelt werden kann [Youdim, et al. 1989]. Durch die Herabsetzung seiner Bioverfügbarkeit in Zusammenhang mit Radikalen und den resultierenden Stoffwechselveränderungen [Kap. 1.6.5.1-5], scheint das α -Syn deren toxische Wirkung in der Zelle zu verstärken.

1.6.5.6 Aggregatbildung des α -Syn

Die Rolle des UPS wurde in [Kap.1.5] angesprochen. Desweiteren führt das schon erwähnte Protein Calmodulin im aktivierten Zustand zu einer vermehrten Fibrillenformation des α -Syn (WT/A53T/A30P) [Martinez, et al. 2003]. Auch Eisen und Radikale des Dopamins (DA-Quinone) fördern die Aggregatbildung des α -Syn [Ostrerova-Golts, et al. 2000]. Die oxidativen Verbindungen von Dopamin mit α -Syn fördern die Bildung von protofibrillären Ablagerungen, indem deren Umwandlung in Fibrillen gehemmt wird [Conway, et al. 2001]. Das α -Syn bildet als Zwischenstufe zu den Fibrillen lösliche nicht-fibrilläre Oligomere, die Protofibrillen [Lee & Lee 2002; Conway, et al. 2001]. Diese Protofibrillen erscheinen als kleine, über das gesamte Zytoplasma verteilte Aggregate, die sich zu unlöslichen Fibrillen mit β -Faltblattstruktur und amyloid-ähnlichen Filamenten verbinden [Lee & Lee 2002; Narhi, et al. 1999] bevor sie sich zu größeren unlöslichen fibrillären Strukturen zusammenschließen, um sich dann letztendlich zu den Lewy-Körperchen zu vereinigen. In-vitro zeigte sich, dass beide mutierte Formen des α -Syn die Bildung von Protofibrillen (A53T schneller als A30P)



und das A53T die Bildung von Fibrillen beschleunigt. [Conway, et al. 1998; Conway, et al. 2000]. Die Protofibrillen scheinen eine toxische Wirkung zu haben und deren Ablagerungen in Fibrillen durch Verbrauch von Protofibrillen einen protektiven Effekt [Lansbury 1999]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass diese Protofibrillen die Permeabilität von Speichervesikeln erhöhen. Die Folge ist ein Anstieg der zytoplasmatischen Dopaminkonzentration und damit des oxidativen Stresses [Volles & Lansbury 2002; Zhu, et al. 2003]. Hier scheint ebenfalls einiges dafür zu sprechen, dass α -Syn über die Bildung von toxischen Produkten in Verbindung mit Radikalen, deren zellschädigende Wirkung verstärken kann.

1.6.5.7 Exprimierung von α -Syn

Transgene Mäuse, welche humanes WT- α -Syn überexprimierten wiesen Bildung von Einschlusskörperchen auf und zeigten Zellverluste in der SN [Masliah, et al. 2000]. A53T und A30P α -Syn aggregieren leichter als das WT α -Syn [siehe Kap. 1.5.5.6]. Übermäßige Produktion von WT α -Syn führt schneller zur Aggregatbildung [Kahle, et al. 2000] und ist für die Zelle toxisch. Noch toxischer ist eine Überproduktion der beiden Mutationsformen (A53T/A30P) [Ostrerova, et al. 1999]. Im *Drosophila*-Modell kam es bei Überexprimierung von mutiertem α -Syn und WT α -Syn zu Verlusten dopaminerger Neurone [Feany & Bender 2000]. Bei Überexprimierung von α -Syn (A53T/A30P>WT) entstehen vermehrt ROS [Junn & Mouradian 2002]. Wahrscheinlich durch Störung der Mitochondrienfunktion entsteht oxidativer Stress in der Zelle [Hsu, et al. 2000]. Dieser führt über DNS-Strangbrüche zur Aktivierung der PARP-1 (PARS) [siehe Kap.1.4.2.2]. Dieses Enzym ist in der Lage, die Genexpression des α -Syn über Bindung an den Genabschnitt NACP-rep1 des SNCA (α -Syn-Gen) zu vermindern [Chiba-Falek, et al. 2005]. Hinzu kommt, dass größere Mengen an vorhandenem α -Syn funktionell wichtige Kinasen in einem zellschädigenden Ausmaß hemmen könnten [siehe Kap.1.5.5.2].

Interessant ist auch, dass oxidativer Stress die Zelle mehr α -Syn produzieren lässt und in-vitro die Zellen scheinbar widerstandsfähiger werden, allerdings nur in sehr niedrigen ROS Konzentrationen [Quilty, et al. 2005]. Möglich wäre, dass sich hier kaum etwas an der Bioverfügbarkeit von α -Syn ändert und leicht erhöhte α -Syn Konzentrationen über Hemmung eines Signalweges die Zelle vor oxidativen Stress schützen [Hashimoto, et al. 2002].

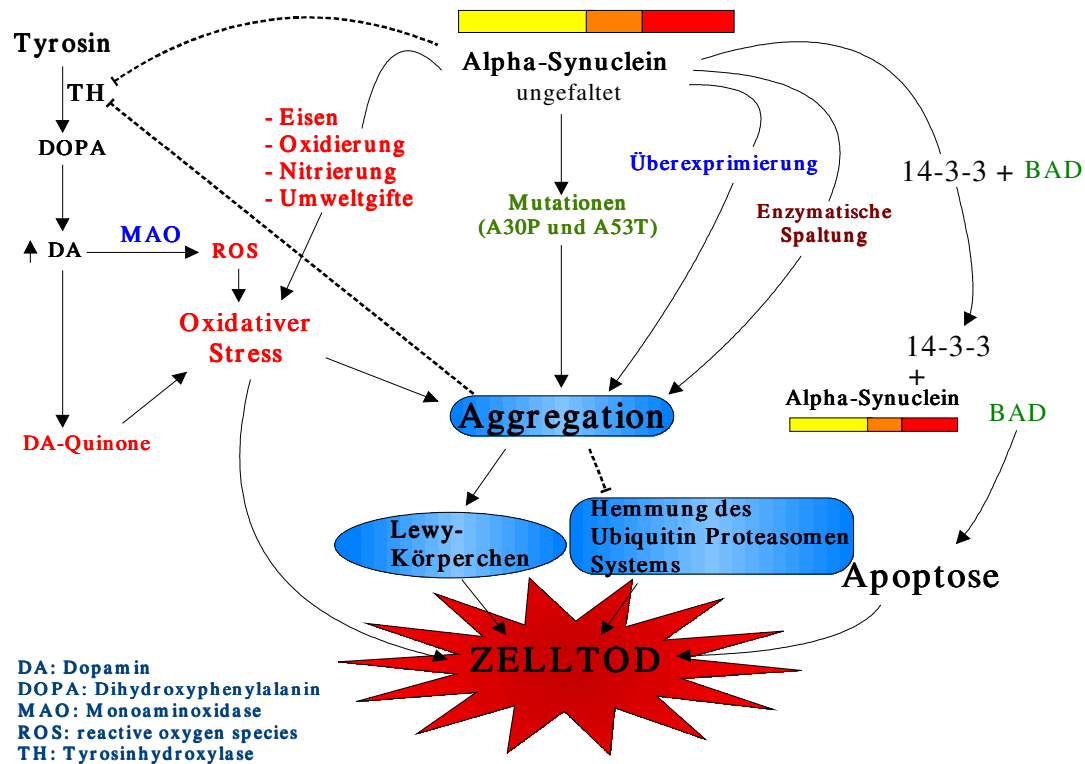


Abb.1.14: Schaubild mit Faktoren, die in Zusammenhang mit α -Syn zum Zelltod führen können modifiziert nach [Recchia, et al. 2004]

1.7 α -Syn in Parkinson-Modellen

1.7.1 α -Syn und MPTP

Eine Behandlung mit MPTP führt zu einer ansteigenden Produktion und Aggregation von α -Syn [Kowall, et al. 2000; Purisai, et al. 2005; Vila, et al. 2000]. Der Grund für die Aggregation könnte der induzierte oxidative Stress sein. Behandlung mit MTPT führt zu Komplex I Hemmung in der Atmungskette und zur Freilassung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Das sich im Zytosol akkumulierte Cytochrom C führt in Folge zu α -Syn Ablagerungen. In-vitro konnte die Akkumulation von Cytochrom-C und α -Syn durch Tali- und Pramipexole erfolgreich verhindert werden [Kakimura, et al. 2001]. WT α -Syn scheint sogar die Zelle vor einem ATP Verlust in Mitochondrien zu schützen [Jensen, et al. 2003]. Auch in geschädigten Axonen, spielen das WT α -Syn und auch das (A53T) α -Syn hinsichtlich Neuroprotektion und Regeneration eine Rolle [Quilty, et al. 2003; Manning-Bog, et al. 2003].

Studien, die den Effekt von MPTP in [A30P] transgenen Mäusen untersuchen sollten, fanden in einer Studie keinen Unterschied in der MPTP-Toxizität zwischen [A30P] α -Syn transgenen und nicht-transgenen Mäusen des gleichen Stammes [Rathke-Hartlieb, et al. 2001]. In einer anderen Studie mit transgenen A30P- α -Syn Mäusen nahm die MPTP-Empfindlichkeit zu [Nieto, et al. 2005]. Auch transgene WT α -Syn exprimierende Mäuse waren durch eine höhere DAT-Dichte anfälliger für MPTP [Richfield, et al. 2002]. In-vitro zeigte sich bei mutante α -Syn (A53T und A30P) eine DAT abhängige Toxizität bei sehr kleinen MPP⁺ Konzentrationen [Lehmensiek, et al. 2002]. Durch homologe Rekombination erzeugte α -Syn KO Mäuse zeigten sich im Vergleich mit α -Syn WT Mäusen unempfindlicher gegenüber MPTP [Dauer, et al. 2002; Drolet, Behrouz, et al. 2004; Klivenyi, Siwek, et al. 2005; Schluter, Fornai, et al. 2003; Fornai, Schluter, et al. 2005]. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt nicht in α -Syn KO Mäusen, die eine spontane Deletion des α -Syn Gens aufwiesen [Schluter, et al. 2003]. Trotz fehlenden Proteins scheint die DAT und VMAT2 Aktivität normal in α -Syn KO Mäusen zu sein [Dauer, et al. 2002]. Eine MPTP-Behandlung in WT α -Syn Mäusen erzeugte einen dosisabhängigen Verlust des VMAT2 im Striatum, der nicht in α -Syn KO Mäusen auftrat [Drolet, et al. 2004].

Bisher ist die Rolle des α -Syn in der MPTP-Toxizität nicht hinreichend geklärt. Dauer et al. sprechen von einem „prämitochondralen Komplex“ und grenzen damit die Suche ein. Weitere Vermutungen gehen dahin, dass in α -Syn KO Mäusen der durch Neurotoxine induzierte oxidative Stress geringer ausfällt [Klivenyi, et al. 2006]. Drolet et al. sieht den Schutz der α -Syn KO Mäuse in der gesteigerten Aufnahme von MPP⁺ in die Speichervesikel, bedingt durch geringeren Verlust von VMAT2 [Drolet, et al. 2004]. Schlüter et al. sprechen dem α -Syn keine entscheidende Rolle in der MPTP-Toxizität zu [Schluter, et al. 2003].

1.7.2 α -Syn und 6-OHDA

In-vitro zeigte sich eine Zunahme der 6-OHDA-Toxizität durch Überexpression von mutiertem α -Syn [Zhou, et al. 2006]. In-vivo führt eine Behandlung mit 6-OHDA zur Abnahme der Genexpression der TH und des α -Syn in der SN [Zeng, et al. 2002].

Versuche an Zellkulturen zeigten eine Veränderung der 6-OHDA Aufnahme in die Zellen in Abhängigkeit vom α -Syn und vorhandenem DAT. In Abwesenheit von α -Syn wurde nur die Hälfte der normalen Toxinkonzentration in den Zellen und in Anwesenheit von A53T+A30P α -Syn eine noch geringere Konzentration gemessen

[Lehmensiek, et al. 2006]. Allerdings ist die 6-OHDA-Toxizität nicht abhängig von der DAT-Aufnahme, da 6-OHDA bereits extrazellulär durch Radikalbildung Zellen schädigt .

Da 6-OHDA vor allem hohe ROS-Konzentrationen produziert, müsste nach bisherigen Erkenntnissen das α -Syn die Wirkung verstärken. Welche Faktoren im Hinblick auf das α -Syn die entscheidenden Rollen im 6-OHDA-Modell spielen, ist noch nicht geklärt.

1.8 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll erstens die Rolle von α -Syn in zwei verschiedenen in-vivo Modellen des Morbus Parkinson geklärt werden. Die Rolle von α -Syn in 6-OHDA Paradigmen kennt man bisher nur in-vitro. Zweitens sollen dabei auch Rückschlüsse auf den Mechanismus der Toxizität von α -Syn gewonnen werden. In der Literatur wurde eine Radikal-erhöhende Eigenschaft von α -Syn als die Toxizität erhöhender Mechanismus vorgeschlagen, welche nur indirekt gezeigt werden konnte [Klivenyi, et al. 2006]. Deswegen wird dem MPTP-Modell, für das eine protektive Wirkung einer α -Syn Deletion bereits beschrieben wurde, das 6-OHDA-Modell gegenüber gestellt, welches verglichen mit MPTP eine stärkere Radikalproduktion aufweist. Es sollte darüber hinaus drittens gezeigt werden, ob auch im MPTP-Modell die Radikalproduktion in den α -Syn KO Tieren verringert ist.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Zwei Mäusestämme wurden für die Experimente eingesetzt. Der erste besteht aus männlichen Wildtypmäusen (Bezeichnung: C57/Bl6; Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und der zweite aus α -Syn knock-out Mäusen (B6;129X1-*Snc α ^{tm1Rosl}*), kurz α -Syn KO (JAX[®]; The Jackson Laboratory). Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 24 und 26 Gramm. Den Tieren wurde nach Erhalt eine mindestens 1 wöchige Eingewöhnungszeit in ihrem jeweiligen Tierstall gewährt bevor mit dem Experiment begonnen wurde.

Die Tiere wurden in Gruppen von je drei Mäusen und unter folgenden Standardbedingungen gehalten: Raumtemperatur $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$ und zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus (Licht an um 7:00 Uhr).

In den Kunststoffkäfigen mit Metallabdeckung (Makrolon[®]) hatten die Mäuse jederzeit freien Zugang zu ihrem Standardfutter (Altromin Haltungsdiät) und zum Trinkwasser aus handelsüblichen Kunststoffflaschen.

Das Experiment und die stereotaktische Operation mit anschließender Dekapitation der Mäuse wurde von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) genehmigt.

2.2 Eingesetzte Substanzen

2.2.1.1 Pharmaka

MPTP	(Research Biochemicals International)
(1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin)	(RBI,Köln)
(intraperitoneal appliziert siehe Kap.)	
6-OHDA (6-Hydroxydopamin)	(Research Biochemicals International)
(mittels Hamilton Spritze appliziert siehe Kap.2.5)	(RBI,Köln) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.1.2 Verwendete Lösungen und deren Herstellung

Antifreeze (Ansatz für 1 Liter):

1,57g NaH_2PO_4

5,18 g Na_2HPO_4

400 ml aqua dest

300 ml Ethylenglycol

300 ml Glyzerin

0.1 M PB-Puffer: Stammlösung (Ansatz für 10 Liter)

115 g Na_2HPO_4

26,22 g NaH_2PO_4

pH ist ziemlich genau 7,4; wenn nicht, mit 1M NaOH einstellen und danach filtrieren.

8% PFA Lösung (Ansatz für 500 ml vor Gebrauch ansetzen, da diese nicht lange haltbar ist)

241,66 ml aqua dest: wird auf 60°C (in der Microwelle oder Rührer) erwärmt

20 g PFA unter Rühren zugeben

1 Tropfen 30 % NaOH dazugeben, Lösung filtrieren

25 % Saccharose Ansatz für 100 ml

25 g Saccharose

100 ml 0,1M PB-Puffer

wenn die Hirne länger als 2 Wochen aufgehoben werden müssen, gibt man der Lösung

0,1% (0,1 g auf 100 ml abwiegen) NaN_3 (Natriumazid) dazu

2.2.2. Substanzen und Chemikalien für

2.2.2.1 Operationsvorbereitung

Bepanthen[®] Augensalbe

(Roche)

Chloralhydrat

(Merck, Darmstadt)

Kodan[®]-Tinktur forte

Schülke & Mayr GmbH

2.2.2.2 Intraperitoneale MPTP-Injektion

MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin)	(Research Biochemicals International (RBI), Köln)
Natriumchloridlösung 0,9%	(Braun-Melsungen AG)

2.2.2.3 Salicylat-Assay

Na-Salicylat	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
--------------	---

2.2.2.4 Stereotaktische Injektion

6-OHDA (6-Hydroxydopamin)	(Research Biochemicals International (RBI), Köln) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ascorbinsäure	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Natriumchloridlösung 0,9%	(Braun-Melsungen AG)

2.2.2.5 HPLC

2.2.2.5.1 Zur Bestimmung von DA, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA

Acetonitril (gradient grade / Chromasolv)	(Roth)
Di-Natrium-EDTA	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Methanol	(Riedel-de-Haën)
Natriumacetat wasserfrei p.a.	(Merck, Darmstadt)
Oktansulfonsäure (Natriumsalz)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
HClO ₄ 60% p.a.	(Merck, Darmstadt)
HCL min. 32%	(Riedel-de-Haën)

Triethylamin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
--------------	---

2.2.2.5.2 Zur Bestimmung von MPP⁺ und Salicylat

Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Acetonitril	(Roth)
(Puffer) Phosphorsäure	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
H ₂ O	(Millipore)

2.2.2.6 Referenzsubstanzen für die Eichlösungen

Dopamin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
---------	---

2.2.2.7 Anfertigen und Fixieren der Gehirnschnitte:

Methanol (gradient grade)	(Merck, Darmstadt)
Formaldehyd 37% stabilisiert	(Merck, Darmstadt)
Eisessig	(Merck, Darmstadt)
Aqua dest.	(Merck, Darmstadt)
NaOH	(Merck, Darmstadt)
Paraformaldehyd, reinst	(Merck, Darmstadt)
Saccharose	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
0,1 % Natriumazid	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	(Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	(Merck, Darmstadt)
Ethylenglycol	(Merck, Darmstadt)
Glycerin 87 %	(Merck, Darmstadt)
Gelatine	(Merck, Darmstadt)

2.2.2.8 Immunhistochemische Färbung

TH-Antikörper (anti-tyrosine hydroxylase made in mouse)	(Boehringer, Mannheim)
TH-Antikörper IgG(H+L) (anti-mouse, made in horse, biotyniliert)	(Vector /Alexis,USA)

Streptavidin (1:200 in PBS)	(Dako,Dänemark)
Triton X-100	(Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
5 % Normal Horse Serum (NHS) und PBS	(Vector)
3,3' - Diaminobenzidin	(Boehringer, Mannheim)
3 % und 0,01 % H ₂ O ₂ , 10 % Methanol	(Merck, Darmstadt)
Perhydrol (H ₂ O ₂) 30%	(Merck, Darmstadt)
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	(Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Taufkirchen)
Ethanol 96 %	(Merck, Darmstadt)
Xylol	(Merck, Darmstadt)
Chromalaun	(Merck, Darmstadt)
Corbit-Balsam	(Merck, Darmstadt)

2.3 Verwendete Geräte

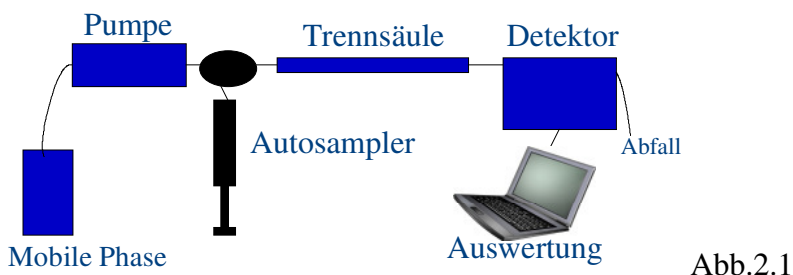
2.3.1 Stereotaktische Operationen

Hamilton [®] Spritzen	(Hamilton, Schweiz)
Stereotaktischer Rahmen	(David Kopf, Tjunga, Kalifornien, USA)
Zahnbohrer	

2.3.2 Herstellung der Homogenate

Plastikreaktionsgefäße 1,6ml	(Biozym Diagnostik GmbH, Hess Oldendorf)
Ultrarax	(Ultra Turrax T5, Bachofer, Reutlingen)
Zentrifuge	Hermle Z 252 MK, Gosheim)
Membranfilter 0,2 µm Porenweite	Spartan 13/0.2 RC, Schleicher&Schuell, Dassel)

2.3.3 HPLC



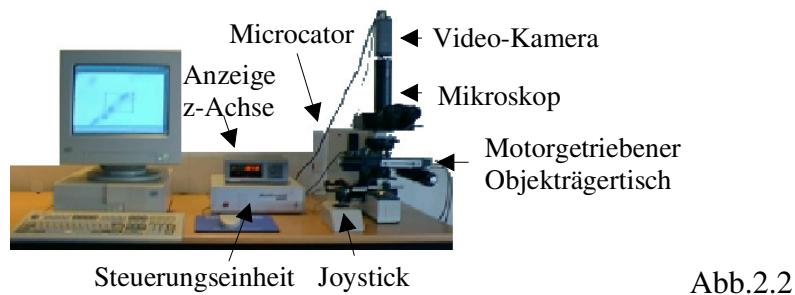
2.3.3.1 Geräte zur Bestimmung von DA, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA

Pumpe:	M300, Gynkotec Germering (Flussrate: 0,5 ml/min)
Autosampler:	GINA 50, Gynkotec, Germering (Temperatur : 4°C, Injektionsvolumen 20µl)
Trennsäule :	Vertex 125x3 mm mit Vorsäule 5x3mm Nucleosil 120-3 C18, Knauer, Berlin
Detektor	BAS LC 4B, Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA
Arbeitselektrode:	Glassy-Carbon, BAS, West Lafayette, USA
Referenzelektrode:	Ag/AgCL, BAS, West Lafayette, USA
Detektorempfindlichkeit:	2 nA/V
Oxidationspotential:	+750 mV
Temperatur der Messzelle:	22°C

2.3.3.2 Geräte zur Bestimmung von MPP⁺ und Salicylat

Degasser	4-Kanal-Degasser, Knauer, Berlin
Pumpe	Beckmann 114 M, Solvent Delivery Modul, USA (Flussrate 1ml/min)
Autosampler	Gilson/Abimed 401/231, Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld Probentemperatur 26°C Injektionsvolumen 20 µl
Säule	Vertex 250 x 4 mm mit Vorsäule 5 x 4 mm, Nucleosil 100 C 18, Knauer, Berlin
Detektor	UV-Detektor ERC 7210, Alteglofsheim $\lambda = 295 \text{ nm}$

2.3.4 Stereologisches Verfahren



- Mikroskop Olympus BX51 und C.A.S.T. 2.00.04 Software (Olympus Dänemark A/S 1999)
- PC System mit Monitor and MS Windows
- Motorgetriebener x-y-z Objekttisch mit Steuerung und Joystick
- Microcator (registriert und misst Objekttischbewegungen) mit digitaler Auszählbox
- Farb CCD Kamera mit Stromversorgung und Video Frame Grabber

2.4 Das MPTP-Parkinson-Mausmodell

2.4. MPTP-Parkinson Modelle

2.4.1 Versuchsdurchführung

	Stamm	erhalten	Anzahl der Tiere
Versuchsgruppe 1:	Wildtyp (C57/Bl6)	NaCL	11
Versuchsgruppe 2:	Wildtyp (C57/Bl6)	MPTP	11
Versuchsgruppe 3:	α -Syn KO (129X1-Snca)	NaCL	10
Versuchsgruppe 4:	α -Syn KO (129X1-Snca)	MPTP	11

Tab.2.1

In der vorliegenden Arbeit wurde das subchronische MPTP-Modell verwendet. Dabei werden die Tiere über 5 Tage mit einer täglichen Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht

MPTP-hydrochlorid behandelt. Die Kontrollen erhalten das gleiche Volumen Lösungsmittel (0,9% NaCl). Es wurden 4 Gruppen gebildet (siehe Tab.2.1).

Bei allen Versuchs- und Behandlungsschritten sowie bei der Einwaage und Herstellung der Lösung wurde auf besondere Schutzmaßnahmen geachtet. Die Tiere wurden nach Behandlung wegen enthaltenem MPTP im Kot und Urin in saubere Käfige umgesetzt, das Streu gesondert entsorgt und die alten Käfige mit Chlorixlösung gespült, um das verbliebene MPTP zu inaktivieren. Am Ende der 5 Tage wurden die Mäuse noch 3 Wochen unter den gleichen Anfangsbedingungen [Kap.2.1] gehalten.

2.4.2 Bestimmung von MPP⁺

Es wurden C57/Bl6 und α -Syn knock-out Mäuse (B6;129X1-*Snc^{tm1Rosl}*) einer einmaligen MPTP-Behandlung unterzogen. Sie erhielten 1x30 mg MPTP i.p. Die Tiere wurden anschließend nach 2h und 4h dekapitiert und die Striata aus den Gehirnen entnommen. Aus dem striatalen Homogenat wurde im Chromatographen mittels UV-Detektion die MPP⁺-Bestimmung durchgeführt.

2.4.3 Salicylat-Assay

Um zu prüfen, ob die Entwicklung von Radikalen in KO Mäusen geringer ist wurden C57/Bl6 und α -Syn KO Mäusen 2h und 4h vor ihrer Dekapitation einmalig 30 mg MPTP i.p. appliziert. Salicylsäure besitzt in-vitro und in-vivo radikalfangende Eigenschaften [Ferber, et al. 1999; Mohanakumar, et al. 2000]. Salicylsäure reagiert mit freien Radikalen durch aromatische Hydroxylierung und dabei entstehen di- und trihydroxylierten Salicylsäurederivate. Um die Radikalbildung detektieren zu können, wurde den Mäusen zusätzlich 100 mg/kg Na-Salicylsäure jeweils 30 min vor der Dekapitation i.p. gespritzt. Aus dem striatalen Homogenat wurde im Chromatographen mittels UV-Detektion Salicylat und mittels elektrochemischer Detektion 2,3-DHBA bestimmt [siehe Kap.2.3.3].

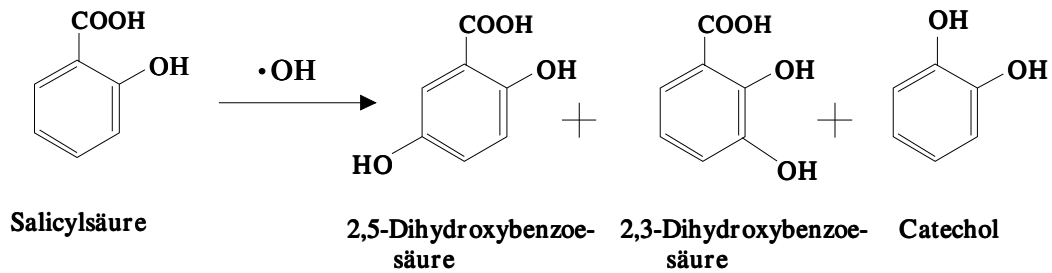


Abb.2.3: Reaktionsmechanismus. Durch die stark reaktiven Hydroxylradikale kommt es zur Hydroxylierung des Phenylringes in der Salicylsäure.

2.5 Stereotaktische Operationen

2.5.1 Vorbereitungen und Durchführung

Für die Durchführung der Injektion der 6-OHDA-Lösung wurden die Mäuse in Narkose versetzt. Dazu wurde den Mäusen eine Dosis von 400 mg/kg KG Chloralhydrat i.p. verabreicht. Um zu testen, ob eine ausreichende Menge des Narkosemittels gespritzt wurde, diente die Schmerzreflexprüfung zur Kontrolle. Anschließend wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf) fixiert. Um die Augen der Mäuse vor Austrocknung zu schützen erhielten die Mäuse Bepanthen®-Augensalbe. Die Schädelkalotte wurde in einem über dem Bregma liegenden Bereich freipräpariert und dabei auch das Periost mitentfernt. Mit dem Bregma als Orientierungspunkt wurde nach vorheriger Desinfektion mit dem Dentalbohrer ein kleines Loch in die Schädelkalotte gebohrt. Um die Injektion im richtigen Hirnareal durchführen zu können, diente der Hirnatlas von Paxinos & Franklin (The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates; Paxinos & Franklin 1996) zur Orientierung. Ausgehend vom Bregma wurden für die Positionierung der Spritze (unilaterale 6-OHDA-Behandlung) folgende Koordinaten gewählt (Abb.2.3):

Vom Bregma :	anterior +0,4 mm	mediolateral +1,8 mm	Ventrodorsal -3,5 mm
--------------	------------------	----------------------	----------------------

Nach der Operation wurde die Wunde wieder verschlossen.

2.5.2 Injektion der 6-OHDA-Lösung (unilateral)

Hierfür wurden zwei Versuchsgruppen aufgestellt.

Gruppe A	2µl 6-OHDA Lsg. in li. Hemisphäre Wildtyp (C57/Bl6)	n= 18
Gruppe B	2µl 6-OHDA Lsg. in li. Hemisphäre: α -Syn KO (B6;129X1- <i>Snc^{tm1Rosl}</i>)	n= 26

Tab.2.2 (6-OHDA Lsg. besteht aus 2µg 6-OHDA in 2µl NaCl gelöst).

Die Injektion wurde mit einer 5 µl Hamilton Spritze durchgeführt. Die Injektionslösung bestand aus 6-OHDA und Ascorbinsäure (2 µg 6-OHDA gelöst in 2 µl physiologischer Kochsalzlösung + 2 mg Ascorbinsäure pro ml dieser Lösung). Nachdem die Spritze exakt positioniert war, wurde das Gemisch mit einem Fluss von 0,5 µl/min und einem Gesamtvolumen von 2 µl injiziert. Anschließend wurde die Hamilton-Spritze noch 5 min in ihrer Position belassen, um eine gute Verteilung des Gemisches in dem Areal zu erzielen. Schließlich wurde die Spritze langsam herausgezogen.

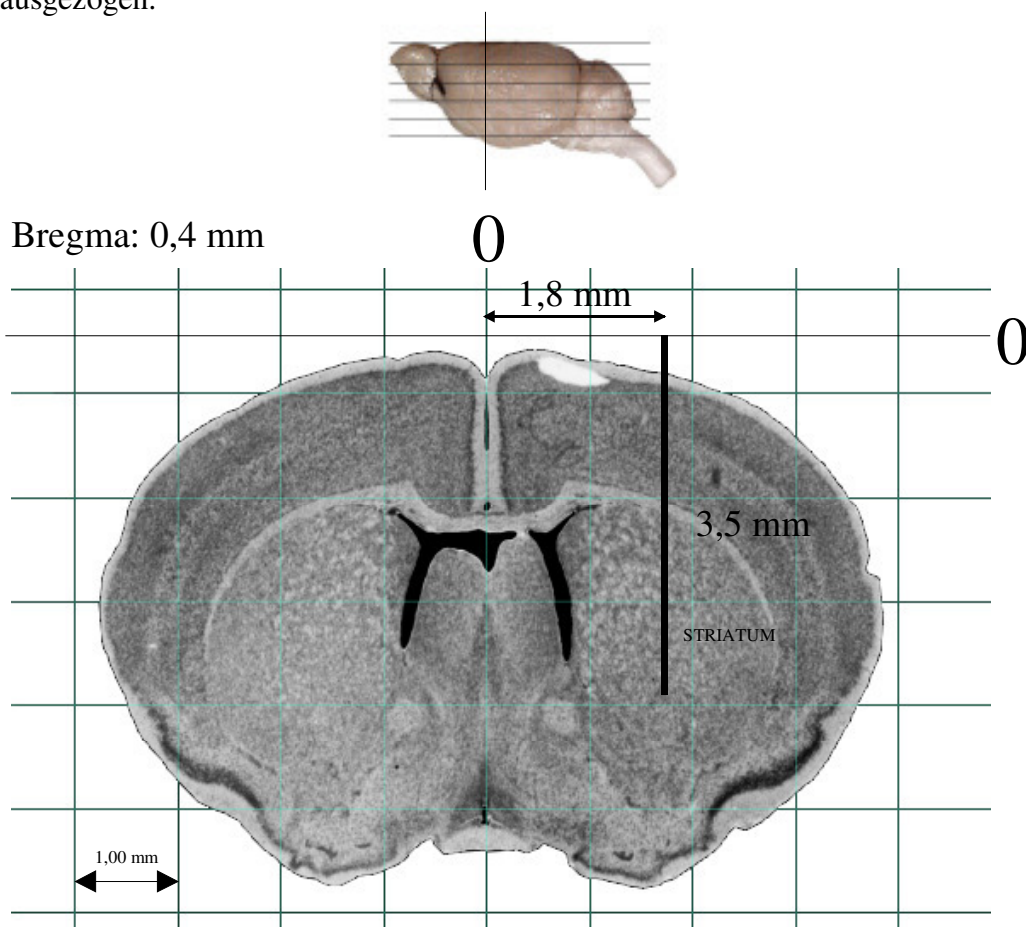


Abb.2.4: Stereotaxie am Gehirn der Maus

2.6 Entnahme und Verarbeitung des Gehirns

2.6.1 Entnahme des Gehirns

3 Wochen nach der letzten Injektion (MPTP und NaCl für 5 Tage, 6-OHDA einmalig) wurden die Mäuse durch Dislokation der HWS getötet und dekapitiert. Anschließend wurde die Schädelkalotte entlang der Sagittalnaht eingeschnitten und zu beiden Seiten hin aufgeklappt. Nach vorsichtigem Abpräparieren der Dura mater wurde das Gehirn entnommen und auf einer Metallplatte dissektiert. Durch einen senkrechten Schnitt wurde zunächst das frontale Drittel abgetrennt und der dorsale Gehirnteil in eine Fixierlösung gelegt. Aus dem dorsalen Anteil wurden die Gehirnschnitte gefertigt, die später immunhistologisch gefärbt (siehe Kapitel 2.6.2) und anschließend ausgezählt wurden.

2.6.2 Herstellung der Homogenate

Dem frontalen Anteil wurde das Striatum entnommen. Dabei wurden zunächst beide Großhirnhälften vorsichtig getrennt und auseinandergezogen. Die darunter gut an ihrer Streifung erkennbaren Striata wurden vorsichtig herausgetrennt und auf einer Aluminiumfolie gewogen. Die Gewebestücke wurden in 1,6 ml Plastikreaktionsgefäße überführt, die zur Proteinfällung 500 µl 0,4 N-Perchlorsäure enthielten. Die Homogenisation der Gewebe erfolgte mittels eines Ultraraxes bei 20.000 Umdrehungen pro Minute (UPM) für eine Dauer von jeweils 1 min. Damit es zu einer quantitativen Proteinfällung kam, wurden die Proben anschließend für 60 min bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden sie bei 13.000 g bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann durch einen Membranfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm filtriert und entweder sofort analysiert oder bei -70°C tiefgefroren.

2.6.3 Analyse der Homogenate

20 µl des Homogenats wurden durch den Autosampler injiziert [siehe Kap.2.3.3]. Die Kammer des Autosamplers war auf 5°C heruntergekühlt. Die Flussrate des Homogenats betrug 0,5 ml/min, und der Druck ca. 136 bar. Das Signal wurde für die Bestimmung von DA, DOPAC, HVA und 2,3-DBHA elektrochemisch detektiert [siehe Kap.2.6.4] und in mV angegeben. MPP⁺ und Salicylat wurde mittels UV-Detektion bestimmt mit einer Flussrate von 1 ml/min.

Eine 7-Punkt-Kalibrierung wurde vor jeder Messreihe durchgeführt. Es wurden dafür je 20 µl der Eichlösung mit der jeweiligen Konzentration eingespritzt. Das Detektionsminimum lag bei einer Konzentration von 5×10^{-10} mol/l (entspricht 10 fmol absolut). Die Analysezeit betrug 20 min für die elektrochemische Detektion und 5 min für die Bestimmung mittels UV-Detektion.

2.6.4 Bestimmung von Dopamin, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA

Hierfür verwendete Geräte siehe [Kap. 2.3.3.1].

Die mobile Phase für die Bestimmung von Dopamin, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA enthielt:

Oktansulfonsäure (Natriumsalz)	0,14 g
Di-Natrium-EDTA	0,1 g
Triethylamin	6 ml
Acetonitril	35 ml
Millipore® Wasser	ad 1000 ml
Phosphorsäure zum Einstellen von pH 2,95	

Die Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure auf einen pH-Wert von etwa 3,00 eingestellt. Danach wurde sie gefiltert (0,45 µm Porengröße, Millipore®).

35 ml dieser Lösung wurden durch Acetonitril ersetzt.

Die Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure auf einen pH-Wert von genau 2,95 eingestellt. Das Fließmittel wurde mindestens im Abstand von zwei Wochen neu hergestellt.

2.6.5 Bestimmung von MPP⁺ und Salicylat mittels UV-Detektion

Hierfür verwendete Geräte siehe [Kap. 2.3.3.2].

Der neurotoxische MPTP-Metabolit MPP⁺ ist aufgrund des in seiner Struktur vorhandenen Phenylrings mittels UV-Detektion quantitativ zu bestimmen [Langston, et al.1984].

Die mobile Phase für die Bestimmung von MPP⁺ und Salicylat enthielt:

Kaliumdihydrogenphosphat	2.722 g
Acetonitril	697 ml
(Puffer) Phosphorsäure	zum Einstellen von pH = 2.5
Millipore® Wasser ad 1000 ml	

2.6.6 Herstellung des Fließmittels

Die Substanzen wurden zur Herstellung der Fließmittel in Millipore R° Wasser zu 1000 ml gelöst und der pH-Wert mit der Phosphorsäure auf pH 2.5 eingestellt. Die Pufferlösung wurde durch einen Membranfilter mit einer Porenweite von 0.45 µm filtriert. Anschließend das Lösungsmittel in der angegebenen Menge in einen Messkolben gefüllt und bis zum Eichstrich mit der Pufferlösung aufgefüllt. Das Fließmittel wurde bei 4°C gelagert und wöchentlich erneuert .

2.7 Anfertigen der Gehirnschnitte

2.7.1 Fixierung des Gehirns

Die entnommenen Gehirne wurden in einem Gemisch von Methanol, Formaldehyd und Eisessig im Verhältnis 8/1/1 über Nacht fixiert. Anschließend wurden sie 1.5 Tage lang in 8 % PFA-Lösung (Ansatz für 500 ml: 241,66 ml aqua dest auf 60°C; 20 g PFA; 1 Tropfen 30 % NaOH) eingelegt. Danach wurde die Lösung gegen eine 25%-ige Saccharoselösung-Phosphatpuffer (PBS)-Lösung ersetzt und abgewartet, bis die Gehirne abermals absanken. Wenn die Lagerungsdauer der Gehirne bis zum Schneiden länger als 2 Wochen betrug, wurde der Saccharoselösung zusätzlich 0.1 % Natriumazid zum Konservieren hinzugegeben.

Die Gefrierschnitte am Kryostat (-18 bis -20°C) von 25 µm Schnittdicke wurden in drei Schnittserien (a, b, c) aufgeteilt. Hierbei wurde die erste Schnittserie (A) in 0.1M PB aufbewahrt (Ansatz für 20 Liter: 230 g Na₂HPO₄; 52,44 g NaH₂PO₄; mit 1M NaOH wurde bei Bedarf auf pH 7,4 eingestellt und danach filtrieren) und alle weiteren Serien (b, c) in Antifreeze (Ansatz für 1 Liter: 1,57g NaH₂PO₄; 5,18 g Na₂HPO₄; 400 ml aqua dest; 300 ml Ethylenglycol; 300 ml Glycerin) bei -20°C aufbewahrt.

2.7.2 Immunhistochemische Färbemethode

Die Arbeitsanleitung der TH-Färbung entstammt dem Neurologischen Labor, Arbeitsgruppe von Prof. Oertel, Philipps Universität Marburg. Die hergestellten Gehirnschnitte [Kap.2.7.1] wurden mit Hilfe der „free floating“ Technik in kleinen Plastikgefäßen auf ihre Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunreaktivität untersucht und gefärbt (siehe Abb.2.2). Je Kästchen wird eine Füllmenge von 1 ml angenommen und

je eine Schnittserie auf 2-3 Kästchen verteilt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit 0.1 M PB gewaschen und mit folgender Lösung (für 10 Kästchen 10 ml bestehend aus 1 ml Methanol, 1 ml H₂O₂ 30 % und 8 ml 0.1 M PB) 15 min. lang inkubiert, um damit die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 0.1 M PB wurden die Schnitte für 60 min mit 5 % NHS und 3 % Triton X-100 präinkubiert (0.5 ml NHS (Normal Horse Serum, Vector S-2000) und 9.5 ml Triton/PB (=0.1 M PB + 0.3% Triton X-100 = 300 µl Triton in 100 ml 0.1 M)) für jeweils 10 Kästchen. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4 °C über Nacht (15-20 h) mit 2

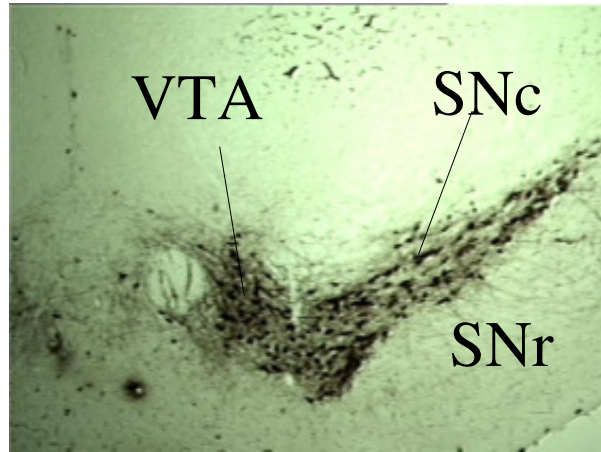


Abb.2.5: TH-positive Zellen in SN und VTA

% NHS, 3 % Triton X-100 und dem TH-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:4000, 40 mg in 1.6 ml aqua dest. lösen, 0.1 ml Aliquots einfrieren). Füllmenge für 10 Kästchen 0.2 ml NHS, 0.8 ml Triton/PB, diese Lösung wurde dann mit 0.1 ml TH-AK 1:40 (1:4000 Endkonz.) infiltriert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte erneut dreimal mit 0.1 M PB gewaschen und anschließend mit 0.3 % Triton X-100 in einer Verdünnung von 1:200 mit dem 2. Antikörper (biotinyliert, 1.5 mg in 1.5 ml aqua dest. gelöst, 0.1 ml Aliquots einfrieren) für 60 min inkubiert. Jeweils 10 ml Triton/PB und 50 µl anti-mouse IgG für 10 Kästchen. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 0.1 M PB erfolgte eine weitere 60 minütige Inkubation, diesmal mit Streptavidin. 1:200. 10 ml 0.1 M PB und 50 µl Streptavidin (P397) für 10 Kästchen. Nach der Inkubation folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit 0.1 M PB. Die Färbung wurde in einer 0.05 %-igen Lösung von 3,3'-Diaminobenzidin unter Zusatz von 0.01 % H₂O₂ durchgeführt. Es wurden hierzu 100 mg DAB in 10 ml H₂O gelöst und dann 10 ml 0.2 M PB zugesetzt, anschließend filtriert. Für je 10 Kästchen wurden folgende frisch angesetzte Lösungen verwendet: 1ml DAB-Konzentrat, 9 ml 0.1 M PB 0.2 ml 1 % H₂O₂ → 50 µl H₂O₂ 30 % + 1,45 ml H₂O. Nach 5 min. wurden die Schnitte in 0.1 M PB Lösung überführt, um die Färbung zu stoppen. Zuletzt wurden die Schnitte wieder dreimal mit 0.1 M PB gewaschen, dann auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Auf einen Objektträger kamen alle Schnitte eines Gehirns. Für das Gelatinisieren wurden 7 g Gelatine in 300 ml H₂O 1 h lang quellen gelassen.

Anschließend 0.18 g Chromalaun zu gelöster erwärmter Gelatine dazugegeben und zum Lösen auf 40 °C erwärmt. Nach anschließender Filtrierung wurde die Lösung zum Gelatinieren der Objektträger in ein Wasserbad gestellt. Am nächsten Tag wurden sie je 10 Minuten in aufsteigender Ethanolreihe entwässert, für 1 h in Xylol belassen und mit Corbit-Balsam konserviert und eingedeckelt.

Die Auswertung (Zellzählung, Foto) erfolgt mittels Lichtmikroskop und Stereologischem Verfahren [Kap.2.8].

2.8 Stereologisches Verfahren

2.8.1 Das C.A.S.T. System

Für die Auszählung wurde das C.A.S.T. (Computer Assisted Stereological Toolbox) System der Firma Olympus eingesetzt. Die technischen Geräte für dieses Verfahren sind im Kapitel [Kap.2.3.4] aufgeführt. Das System wurde für die Auswertung von dreidimensionalen Strukturen entwickelt, welche zur mikroskopischen Untersuchung in zweidimensionale Schnitte zerlegt wurden. Durch eine zu dem System zugehörige Software und Hardware wurde eine computergestützte Methode verwendet, um den Auswertungsvorgang der Gehirnschnitte effizienter und sicherer durchzuführen. Die Software unterteilt das vorher markierte Areal unter Berücksichtigung der jeweiligen Schnittdicke (z-Achse) in einzelne Proben/Samples (x-,y-Achse). Davon wird je nach Auszählfraktion nur ein Anteil ausgezählt. Anschließend wird dann auf das Endergebnis hochgerechnet.

2.8.2 Durchführung und Vorbereitung

Das optische Bild des Mikroskops (Bearbeitung mit 4x Linse) wird von der Kamera digitalisiert und auf dem Bildschirm des Rechners übertragen. Mit Hilfe der Software ist es möglich, das Bild zu bearbeiten und das Hirnareal zur Auszählung in jedem Gehirnschnitt mit einer Markierungslinie zu umranden (siehe Abb2.3). Die SN und die VTA liegen im Bereich interaural -0.08mm bis +1.26mm und vom Bregma ausgehend

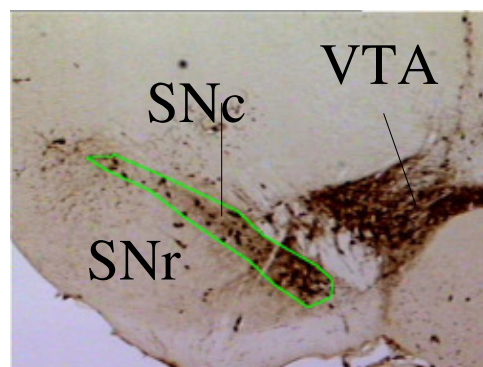


Abb.2.6: Markierte Areal

-2.54mm bis -3.88mm (Koordinaten aus Hirnatlas von Paxinos & Franklin, 1996). Die Dopamin-produzierenden Nervenzellen der SN und VTA sind TH-positiv (enthalten die für Produktion des Dopamins benötigte Tyrosinhydroxylase) und sind durch immunhistochemische TH-Färbung [Kap.2.6.2] erkennbar. Um die beiden Areale voneinander zu unterscheiden, diente der Hirnatlas über stereotaktische Koordinaten des Gehirns von Mäusen [Paxinos & Franklin, 1996] zur Orientierung. Weiterhin half hierbei der dritte Hirnnerv (Nervus oculomotorius) und der mediale Lemniscus, die durch diese Regionen hindurchziehen.

2.8.3 Einstellungen und Zählkriterien

Die Auszählung erfolgte mit der 100x Linse. Beide Hirnhälften und Areale wurden getrennt voneinander und „verblindet“ ausgezählt.

Folgende Einstellungen wurden vorgenommen:

- └ Der Frame Grabber wurde auf 50 % eingestellt [$50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} = 2500 \mu\text{m}^2$] und der Optical dissector auf 15 μm .
- └ Es wurde mit einer Auszählfraktion von 30 % für die S.N. und 25 % für die VTA ausgezählt (Prozentsatz der Samples, welche die markierte Region unterteilen). Nach West, et al. genügen 100-200 Zellen (15 %-30 %) [West, et al. 1991], in diesem Versuch wurden im Durchschnitt pro Schnitt 400-500 Zellen ausgezählt.
- └ Jeder Hirnschnitt wurde zu Beginn der Auszählung einmalig auf dem Bildschirm scharf eingestellt.

Es wurden bei einer Schichtdicke von 25 μm nur Zellkerne gezählt (rundliche Aufhellung, Tyrosinhydroxylase-negativ), da sie bei einem Durchmesser von ca. 10 μm eine präzisere Zählung ermöglichen.

Innerhalb der eingezeichneten Regionen wurden Zellkerne gezählt, welche definitionsgemäß:

- └ die vorher eingezeichnete Umgrenzungslinie berührten
- └ sich innerhalb des Frame Grabbers befanden, ohne die roten Begrenzungslinien zu berühren
- └ die grünen Begrenzungslinien berührten [siehe Abb.2.6].

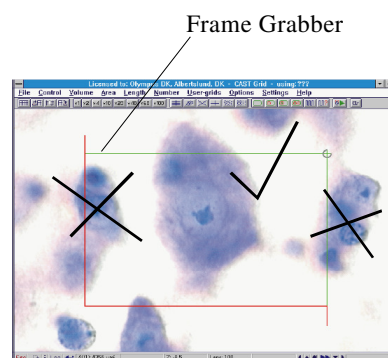


Abb.2.7: Bsp.Bildschirmzählung

Zellen ohne sichtbaren Zellkern wurden nicht gezählt (siehe Material und Methoden [Damier, et al. 1999]). Das ausgezählte Ergebnis wurde anschließend mit der Formel: $3 \cdot 100 / \text{Fraktion}$ multipliziert .

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standard error of the mean (S.E.M.) angegeben. Für statistische Auswertung erfolgte eine one-way ANOVA mit einem post-hoc Tukey Test. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Tierüberleben und Allgemeines

Alle Tiere überstanden das 30 Tage dauernde Experiment. Im 6-OHDA-Modell wurden Mäuse, deren Verluste auf Transmitterebene oder Zellebene geringer als 10 % der kontralateralen Hemisphäre aufwiesen, aus der Auswertung genommen, ebenso Mäuse, deren aus den entnommenen Striata gewonnenen Homogenate nicht in vollem Umfang verwertbar waren. Für die Dopamin- und DOPAC-Bestimmung waren somit aus der 6-OHDA-Gruppe A nur 10 aus 18 Proben und in der 6-OHDA-Gruppe B 17 aus 26 Proben verwertbar.

In wenigen Fällen konnte wegen technischen Fehlern im Herstellungsprozess (mechanische Schäden, keine ausreichende Färbung) keine Verwertung erfolgen. Von den gefertigten Gehirnschnitten war aus Versuchsgruppe 3 in einem Hirnschnitt die SNc, in der Versuchsgruppe 2 in einem Gehirnschnitt die SNc und VTA und in Gruppe B die VTA in einem Gehirnschnitt nicht verwertbar.

3.2 Subchronische MPTP-Behandlung

Die Abb. 3.1, Abb. 3.4 und Abb. 3.7 zeigen die Mittelwerte \pm SEM. Hierfür wurde der Mittelwert in ng/mg Nassgewebe [Kap.2.6.3] zusammen mit der entsprechenden Standardabweichung berechnet. Die jeweils darunter stehenden Abb. 3.2, Abb. 3.4 und Abb. 3.6 geben den Unterschied des Mittelwertes bei den MPTP behandelten und NaCl behandelten Tieren in Prozent an. Abb.3.7 und Abb.3.8 geben den mittleren Dopamin-Umsatz mit Standardabweichung \pm SEM als Verhältnis von umgewandelten DOPAC bzw. HVA zu Dopamin in den Striata an.

Um die Ergebnisse auf einen statistisch signifikanten Unterschied zu prüfen, wurde in den Versuchen mit MPTP eine ANOVA durchgeführt, die einen Gruppenunterschied zeigte. Anschließend wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt. Im 6-OHDA-Versuch wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt.

Das „*“, Zeichen in den Diagrammen bezieht sich auf zwei nebeneinander stehende Balken und weist auf einen statistisch relevanten Unterschied hin.

In allen WT-Mäusen sind statistisch relevante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Dopamin, DOPAC und HVA Konzentration von NaCl behandelten Tieren zu MPTP behandelten Tieren zu beobachten. In den KO Mäusen dagegen ist dieser Unterschied nur in der DOPAC-Konzentration zu sehen. Im Vergleich von behandelten WT Mäusen mit KO Mäusen zeigt sich ein statistisch relevanter Unterschied in den Dopamin-, DOPAC- und HVA- Konzentrationen. So haben die WT Mäuse größere Verluste und es zeigt sich ein positiver Effekt in den KO Tieren. KO Tiere sind vor Verlust an Dopamin durch MPTP besser geschützt als WT Mäuse.

Es zeigt sich, dass der Dopamin-Umsatz in allen behandelten Tieren erhöht ist. Signifikante Unterschiede treten bei allen WT Tieren und im HVA/Dopamin-Umsatz in den KO Tieren auf.

3.2.1 Dopamin-, DOPAC- und HVA-Konzentration im Striatum

Die Dopaminkonzentration ist nach 5x30 mg/kg MPTP in den C57/Bl6 Mäusen deutlich abgesunken. Anders dagegen in den α -Syn KO Mäusen. Es ist zwar ein Trend zu erkennen, dennoch ist der Verlust im one-way ANOVA-Test ($p > 0,06$) nicht statistisch signifikant. Die mit NaCl behandelten Tiere zeigen keine relevanten Unterschiede in der Dopaminkonzentration. Anders die mit MPTP behandelten Tiere: hier ist ein deutlicher Verlust bei den C57/Bl6 Mäusen zu sehen ($p = 0,004$).

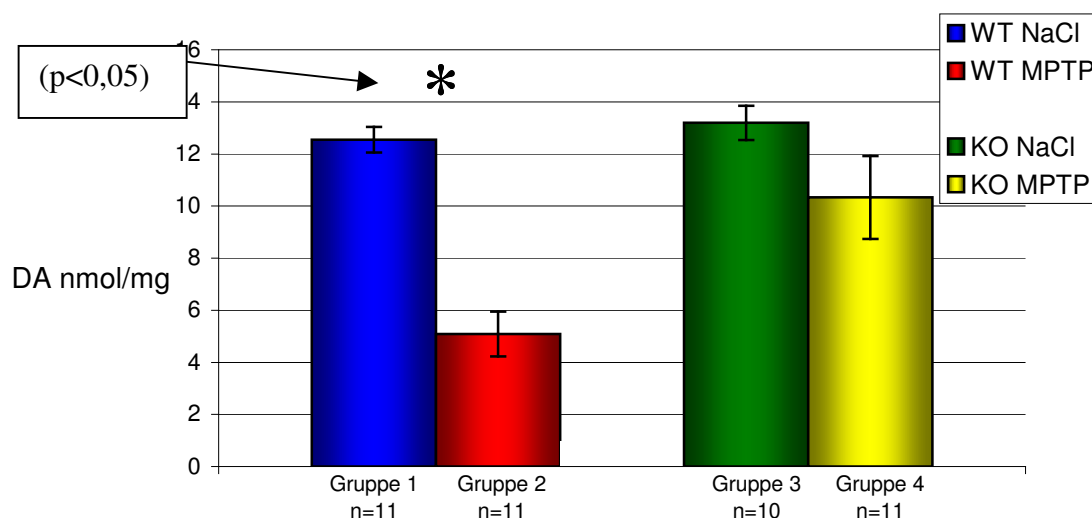


Abb. 3.1: Dopaminkonzentration im Striatum MPTP behandelter und NaCl behandelter WT Mäuse bzw. KO Mäuse \pm SEM.

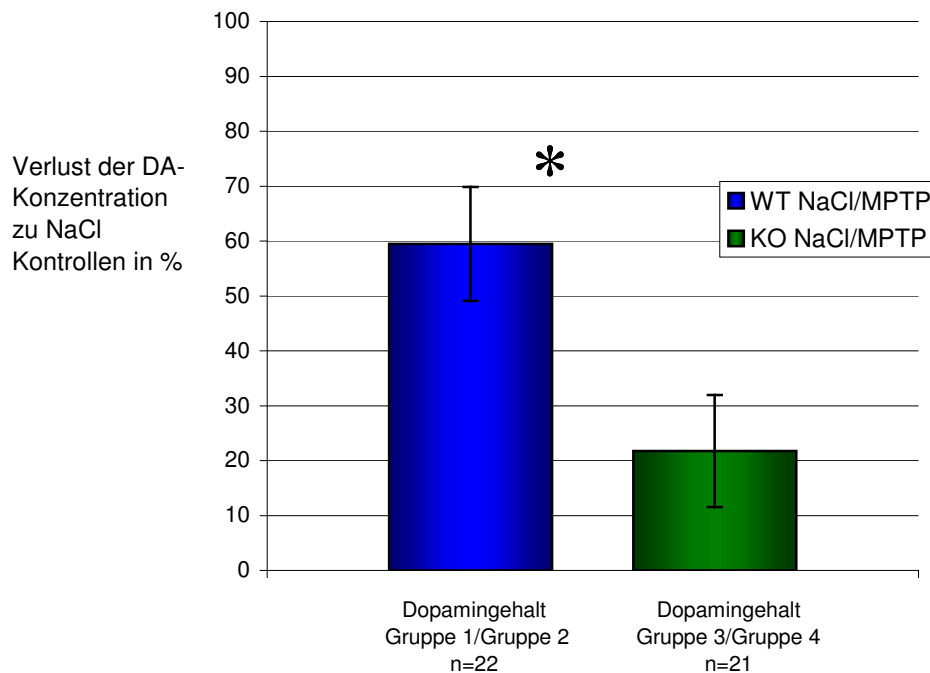


Abb. 3.2: Dargestellt ist die prozentuale Verringerung des Mittelwertes der Dopaminkonzentration von MPTP behandelten zu NaCl behandelten Tieren in WT-Mäusen bzw. KO Mäusen. Es geht deutlich daraus hervor, dass der Verlust an striatalem Dopamin im WT auf den Mittelwert bezogen deutlich stärker ausfällt, als im KO Typ \pm mittlere prozentuale SEM.

Die DOPAC-Konzentration zeigt keinen Unterschied zwischen den mit NaCl behandelten C57/Bl6 und α -Syn KO Mäusen. Allerdings bestätigt sich der Trend und die α -Syn KO Mäuse erleiden signifikante DOPAC-Konzentrationsverluste nach der MPTP-Behandlung ($p < 0.003$). Dennoch sind die Verluste in den C57/Bl6 Mäusen signifikant größer ($p = 0.019$).

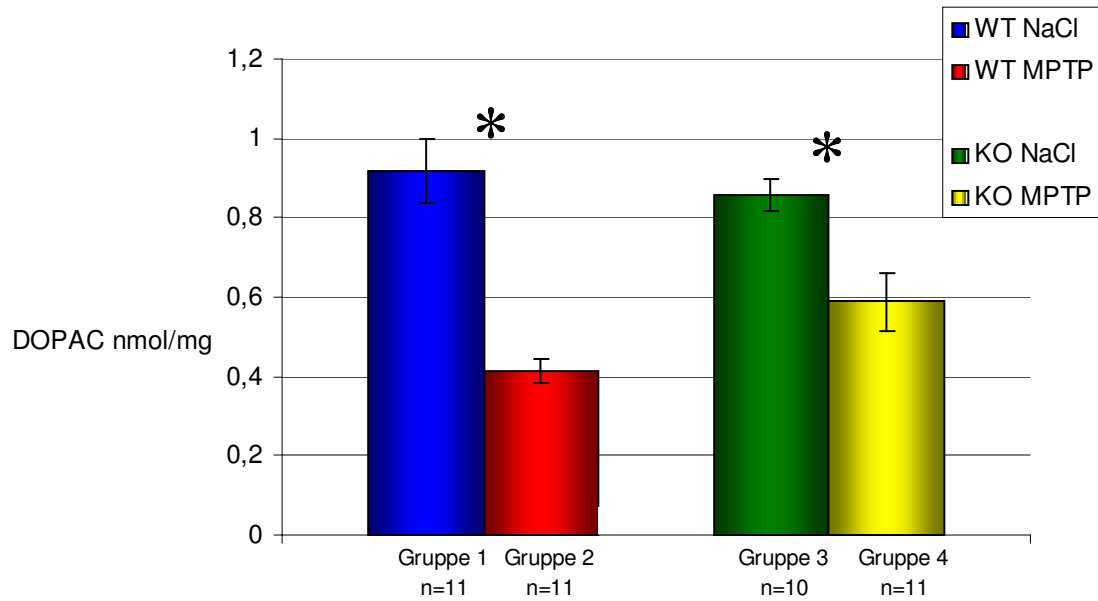


Abb. 3.3: DOPAC-Konzentration im Striatum MPTP behandelter und NaCl behandelter WT-Mäuse bzw. KO Mäuse \pm SEM.

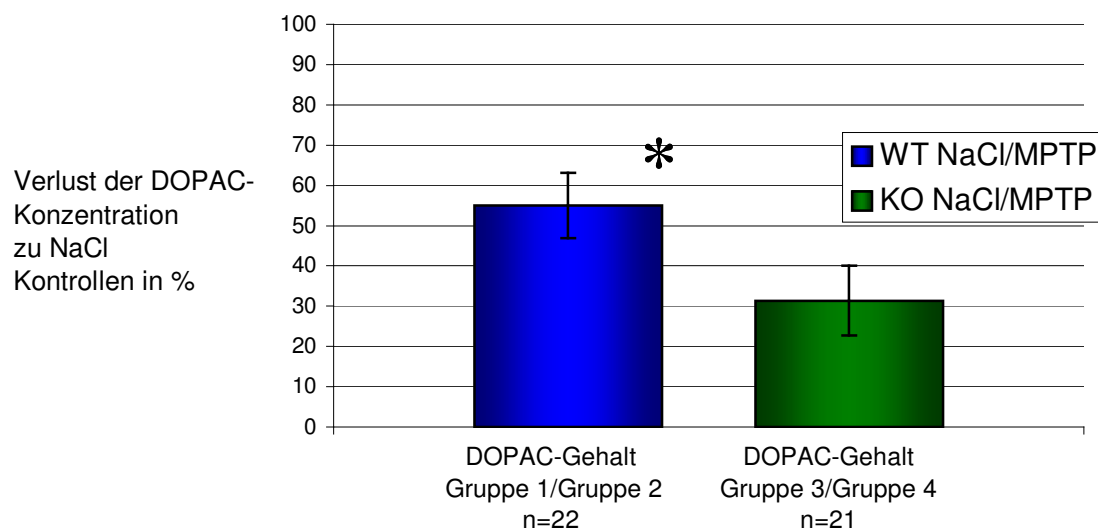


Abb. 3.4: Dargestellt ist die prozentuale Verringerung des Mittelwertes der DOPAC-Konzentration von MPTP behandelten zu NaCl behandelten Tieren in WT Mäusen bzw. KO Mäusen. Der Verlust an striatalem DOPAC auf den Mittelwert fällt im WT deutlich stärker aus \pm mittlere prozentuale SEM.

Es findet sich kein Unterschied in der HVA-Konzentration nach NaCl-Behandlung, dagegen deutliche Konzentrationsverluste nach Injektionen von 5x30 mg/kg MPTP in den C57/Bl6 Mäusen ($p < 0.015$).

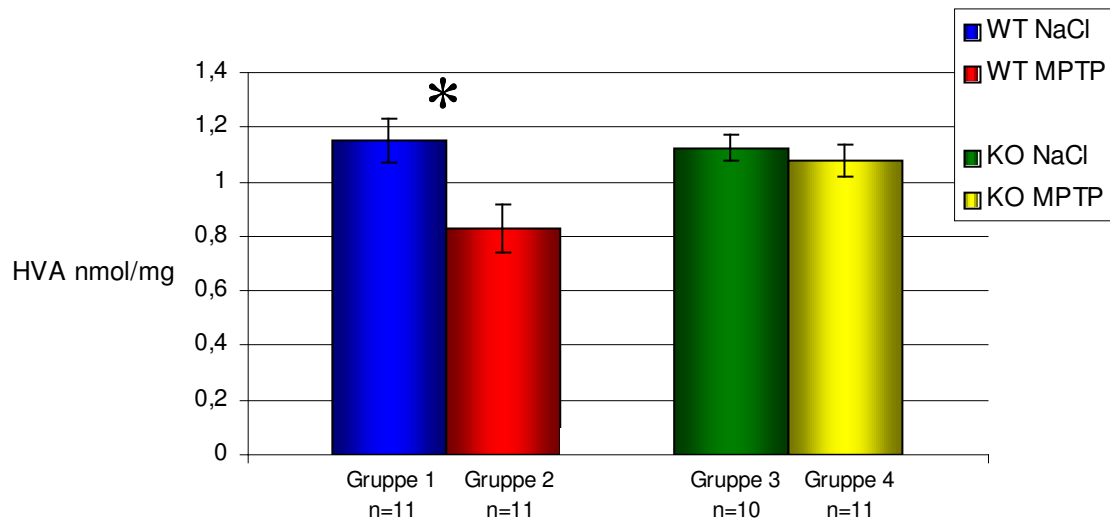


Abb. 3.5: HVA-Konzentration im Striatum MPTP behandelter und NaCl behandelter WT Mäuse bzw. KO Mäuse \pm SEM.

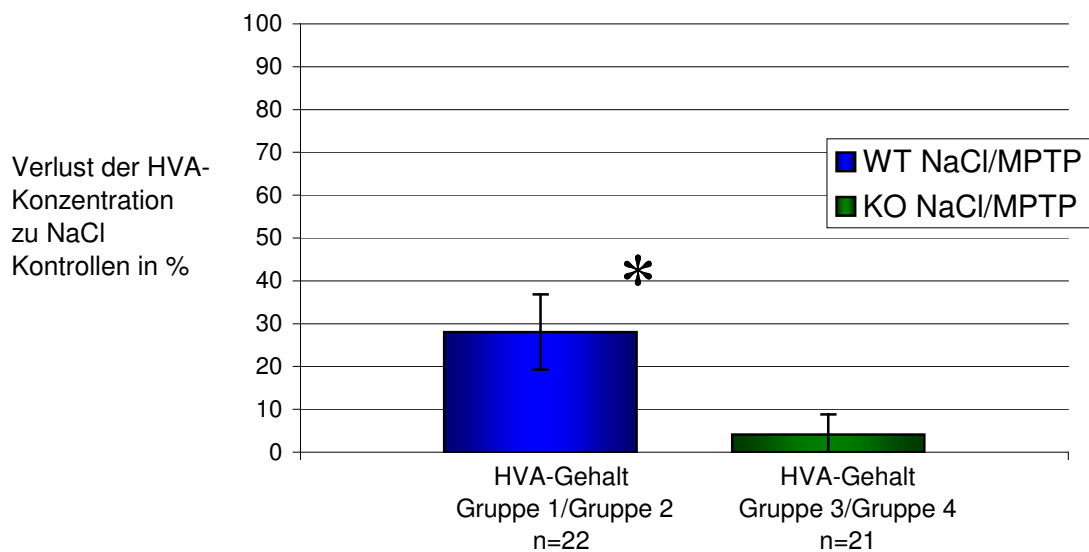


Abb. 3.6: Dargestellt ist die prozentuale Verringerung des Mittelwertes der HVA-Konzentration von MPTP behandelten zu NaCl behandelten Tieren in WT Mäusen bzw. KO Mäusen. Der Verlust an striatalem HVA auf den Mittelwert fällt im WT deutlich stärker aus \pm mittlere prozentuale SEM.

Das nächste Diagramm zeigt den Dopamin-Umsatz nach 5x30 mg/kg MPTP und 21 d nach letzter Applikation. Es findet sich eine Steigerung des Dopamin-Umsatzes in C57/Bl6 Mäusen ($p = 0.046$), dagegen keine Veränderung in den α -Syn KO Mäusen.

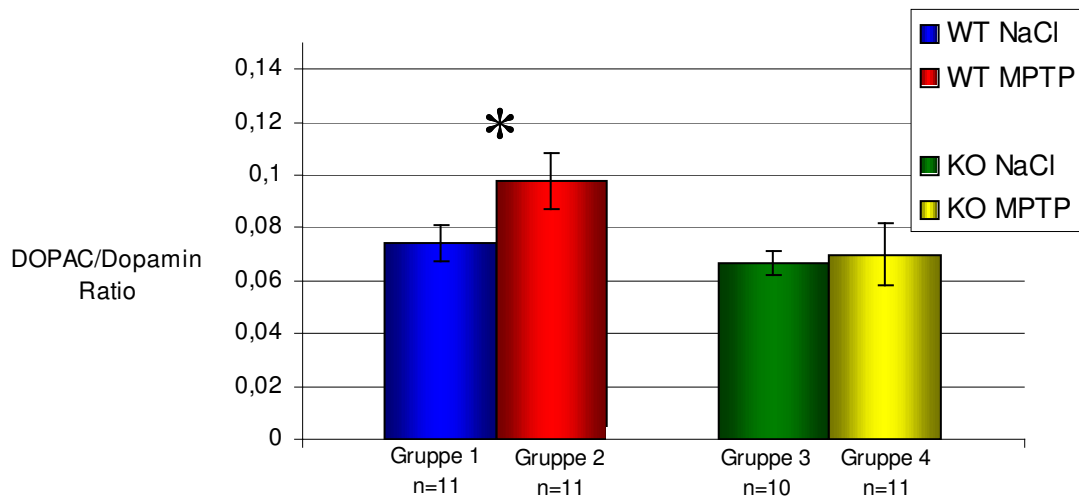


Abb. 3.7: Dopamin-Umsatz in den 4 Versuchsgruppen als DOPAC/Dopamin Ratio dargestellt \pm SEM.

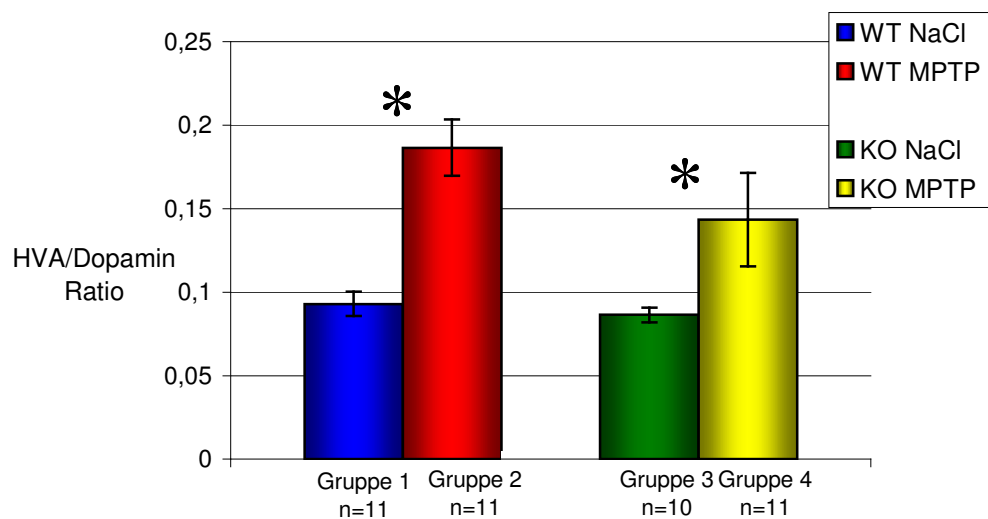


Abb.3.8: Dopamin-Umsatz in den 4 Versuchsgruppen als HVA/Dopamin Ratio dargestellt \pm SEM.

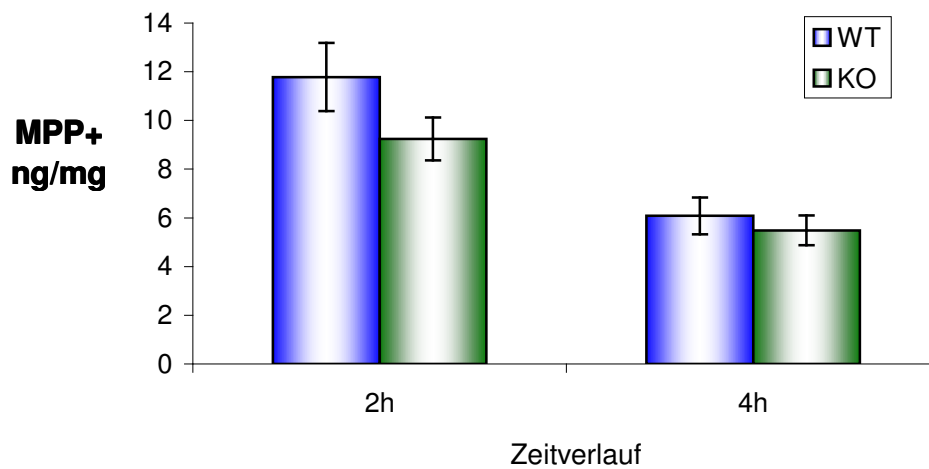


Abb. 3.9: Zeitverlauf der MPP⁺-Gewebekonzentration im Striatum von C57/Bl6-Mäusen (WT) und α -Syn KO Mäusen (KO) nach der Gabe von 1 x 30 mg/kg MPTP i.p. Die Striata wurden nach der Applikation zu den unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und mittels HPLC unter UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 295 nm bestimmt. Hier dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils n = 3 -10 Tieren.

Zusammenfassung der MPP⁺-Ergebnisse:

Nach der Injektion von MPTP erreichen die striatalen MPP⁺ Gewebespiegel zunächst ein Maximum und fallen dann kontinuierlich ab. In α -Syn KO Mäusen (KO) fallen die Gewebespiegel etwas niedriger aus (nicht signifikant).

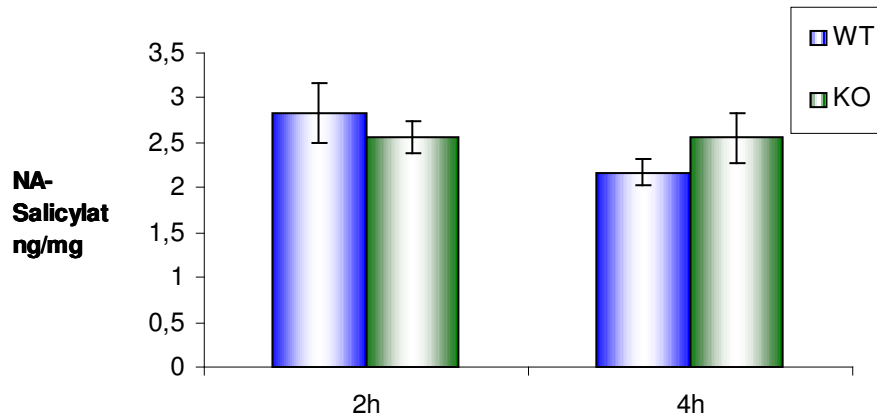


Abb. 3.10: Na-Salicylatspiegel im Striatum von C57/Bl6-Mäusen (WT) und α -Syn KO Mäusen (KO) nach Gabe von 1 x 30 mg/kg MPTP i.p. 2 h bzw. 4 h und 100 mg/kg Na-Salicylat vor Dekapitation. Na-Salicylat wurde mittels HPLC unter UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 295 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils n = 9-10 Tiere.

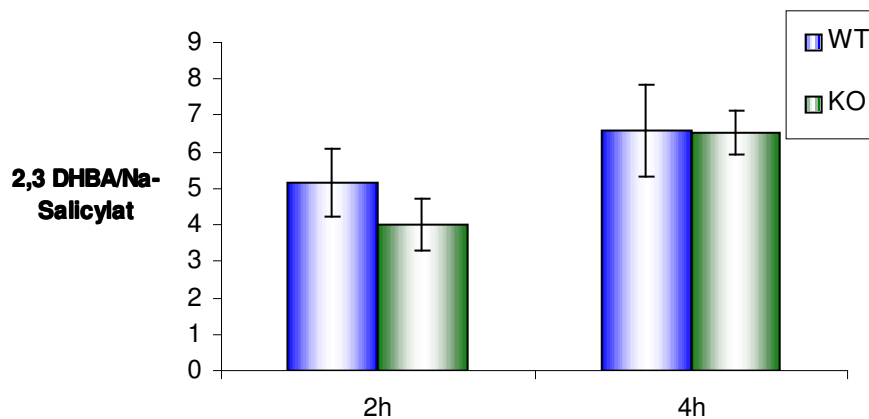


Abb. 3.11: Das Verhältnis von 2,3-DHBA zu Salicylat im Striatum von C57/Bl6-Mäusen (WT) und α -Syn KO Mäusen (KO) nach der Gabe von 1 x 30 mg/kg MPTP i.p. 2 h bzw. 4 h und 100 mg/kg Na-Salicylat vor Dekapitation. Beide Mäusestämme unterscheiden sich nicht in der Konzentration von Hydroxylradikalen im Striatum. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils n = 9-10 Tiere.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Es konnte kein Unterschied im Umsatz von Na-Salicylat nach MPTP-Behandlung festgestellt werden. Die Konzentrationen von Hydroxylradikalen (OH•) im Striatum unterscheiden sich in C57/Bl6-Mäusen (WT) und α -Syn KO Mäusen (KO) nach MPTP-Exposition nicht signifikant.

3.2.2 TH-positive Neurone in der SNc und VTA

Abb. 3.12 und Abb. 3.14 zeigen die Mittelwerte der Anzahl an TH-positiven Neurone nach entsprechender Behandlung \pm SEM. Abb.3.13 stellt den prozentualen Unterschied dar in der mittleren Anzahl TH-positiver Neurone der SNc nach einer NaCl- und MPTP-Behandlung in WT Mäusen bzw. KO Mäusen. Abb.3.12 vergleicht die Anzahl der TH-positiven Zellen in der SNc von MPTP behandelten WT Mäusen bzw. KO Mäusen.

In der SNc der WT Mäuse findet sich ein signifikanter Verlust an TH-positiven Zellen. Der Vergleich der jeweils mit MPTP behandelten Tiere in der Versuchsgruppe 2 und 4 zeigt einen signifikanten Unterschied in der Anzahl gezählter, TH-positiver Zellen.

Die VTA zeigt hier in allen Fällen keine signifikanten Verluste durch MPTP-Behandlung.

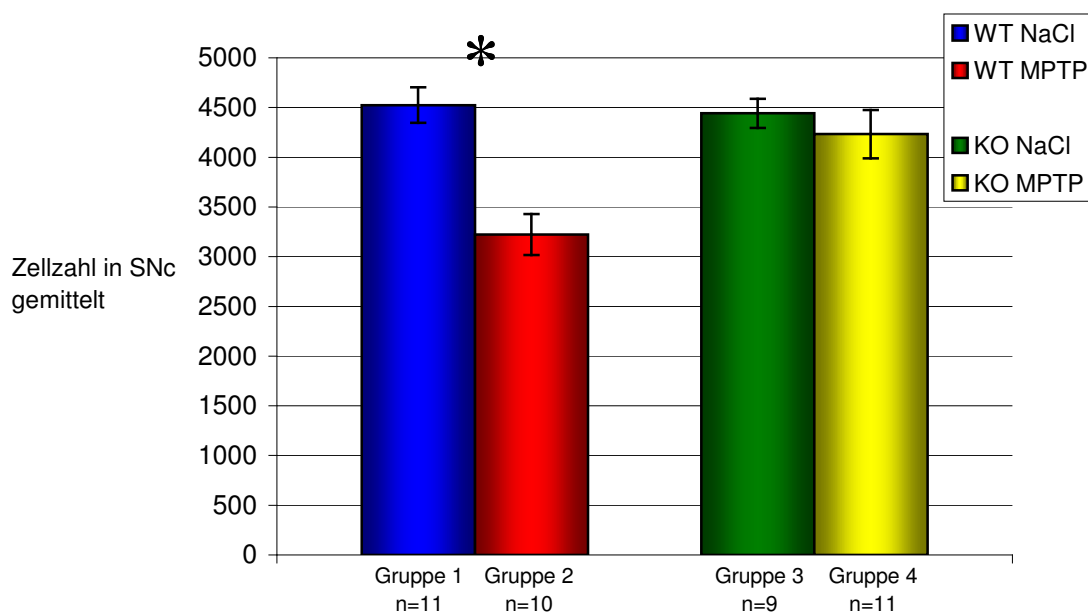


Abb. 3.12: Mittelwerte der TH-positiven Zellen in der SNc von MPTP und NaCl behandelten WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

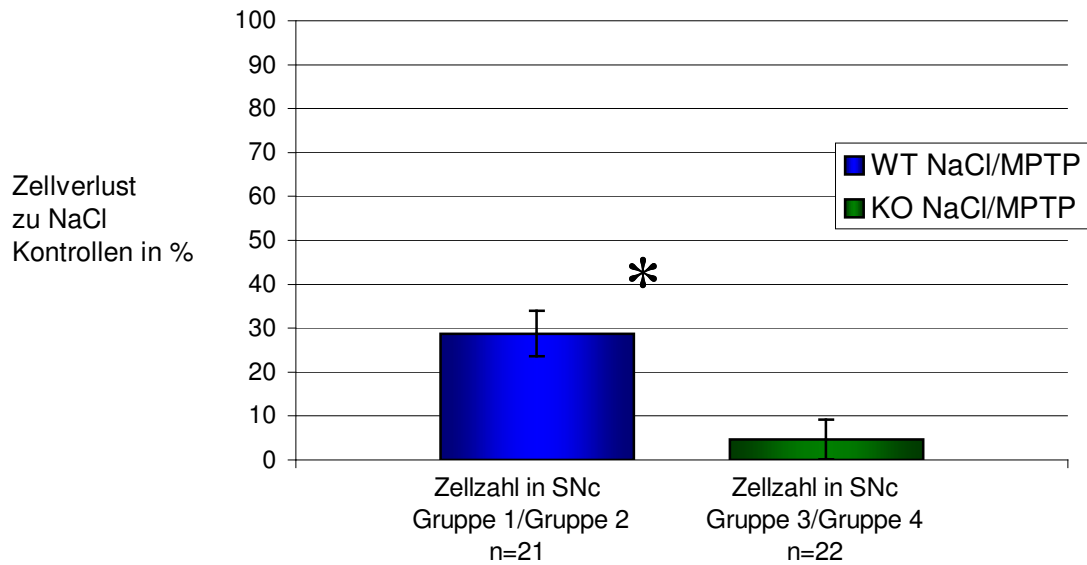


Abb. 3.13: Dargestellt ist die prozentuale Verringerung des Mittelwertes der TH-positiven Zellen in der SNc von MPTP behandelten zu NaCl behandelten Tieren in WT Mäusen bzw. KO Mäusen. Der Verlust an TH-positiven Zellen auf den Mittelwert fällt im WT deutlich stärker aus \pm mittlere prozentuale SEM.

Die VTA nimmt in beiden Mäusestämmen keinen Schaden. Es ist kein Effekt auf der Zellebene in der VTA festzustellen.

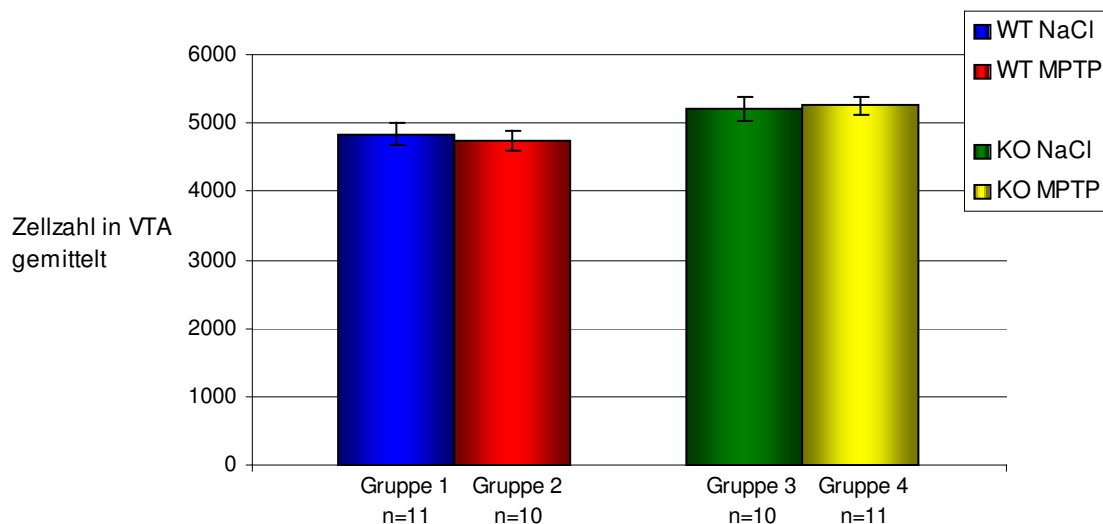


Abb. 3.14: Mittelwerte von TH-positiven Zellen in der VTA von MPTP behandelten und NaCl behandelten WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

3.3 Unilaterale 6-OHDA-Behandlung

3.3.1 Dopamin- und DOPAC-Konzentration im Striatum

Die Abb. 3.15 und Abb. 3.17 zeigen jeweils den Mittelwert der Dopamin- und DOPAC-Konzentration im Striatum in der unbehandelten und behandelten Hemisphäre von WT- bzw. KO Mäusen \pm SEM. Abb. 3.16 und Abb. 3.18 zeigen den resultierenden Verlust der behandelten Hemisphäre an Dopamin verglichen mit der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre in WT bzw. KO Mäusen \pm SEM. Abb. 3.19 zeigt den Dopamin-Umsatz als DOPAC/Dopamin-Ratio der unbehandelten und behandelten Hemisphäre der WT Mäuse bzw. KO Mäuse.

Bei beiden Gruppen (A und B) zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Konzentration von Dopamin und DOPAC beider Hemisphären. Kein signifikanter Unterschied lässt sich jedoch im Vergleich WT und KO Mäuse erkennen. KO Mäuse zeigen hier keine geringere Empfindlichkeit als WT Mäuse.

Der Dopamin-Umsatz ist in beiden Gruppen (A,B) in der behandelten Hemisphäre signifikant erhöht.

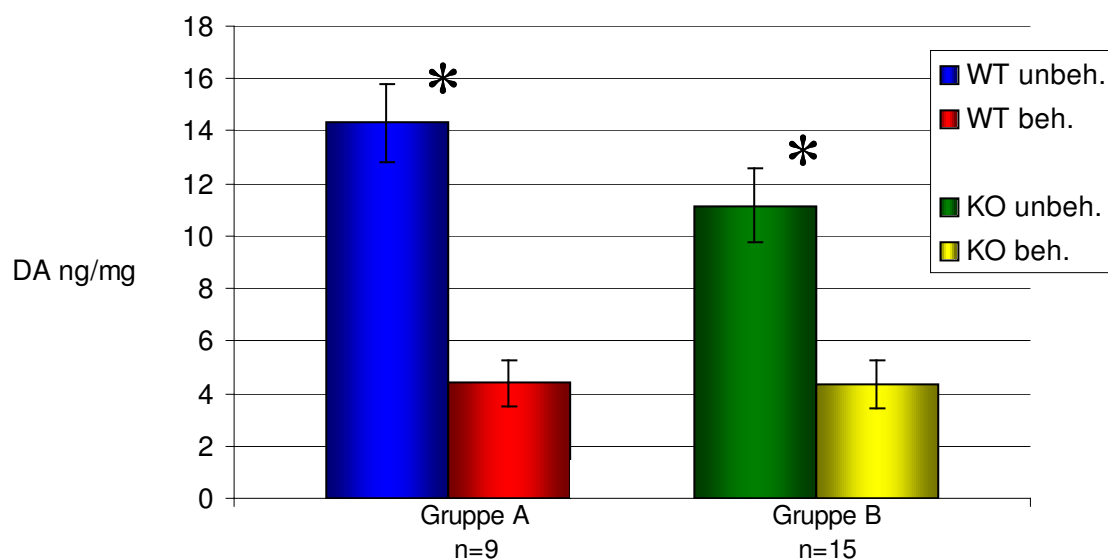


Abb. 3.15: Mittelwert der Dopaminkonzentration unbehandelter und behandelter Hemisphäre in WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

Die Abb.3.15 zeigt jeweils die mittlere Dopamin-Konzentration im Striatum beider Hemisphären im Vergleich \pm SEM.

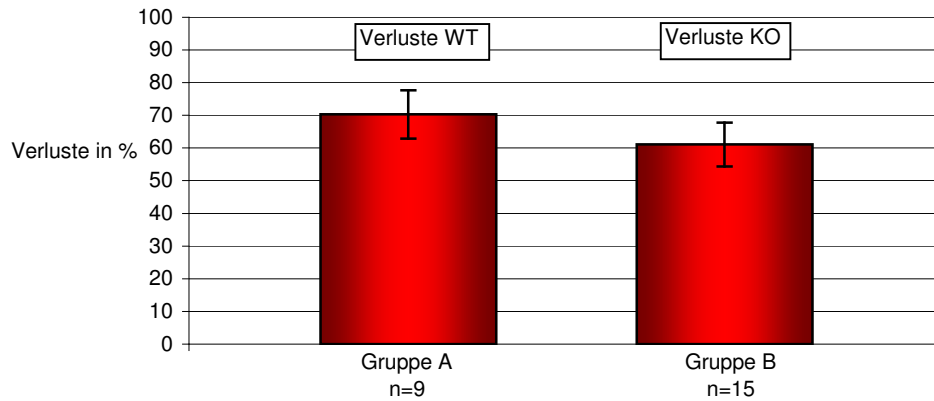


Abb. 3.16: Prozentualer Mittelwert des Verlustes an Dopaminkonzentration durch unilaterale 6-OHDA-Behandlung im Vergleich mit der kontralateralen unbehandelten Hemisphäre \pm SEM.

Abb. 3.16 zeigt die aufgetretenen oder erlittenen Verluste der behandelten Hemisphäre an Dopamin mit der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre im Vergleich \pm SEM.

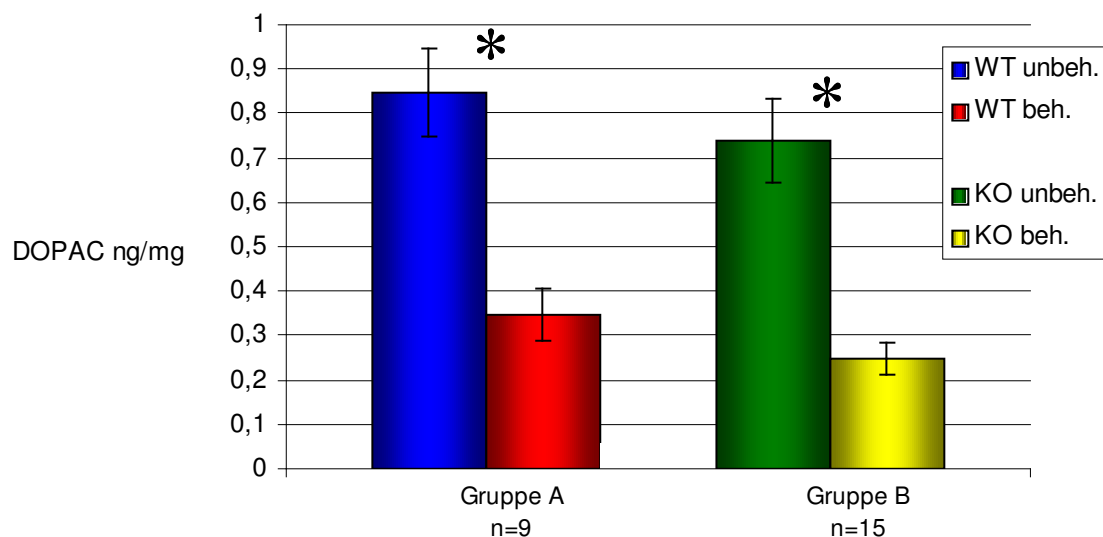


Abb. 3.17: Mittelwert der DOPAC-Konzentration unbehandelter und behandelter Hemisphären in WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

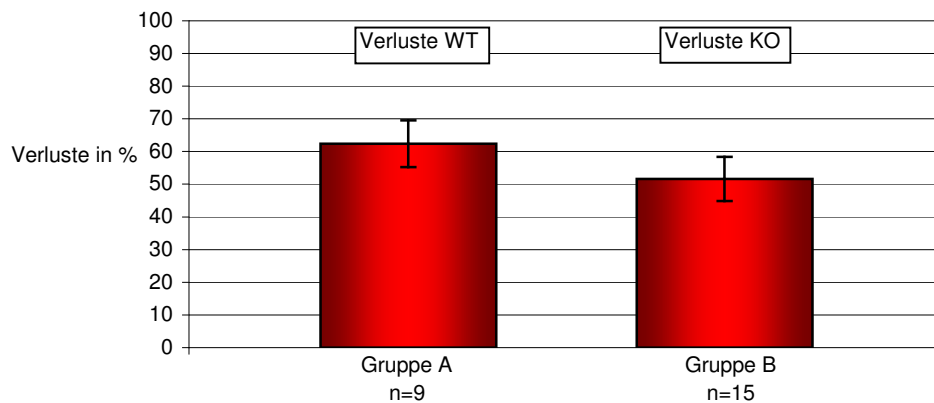


Abb. 3.18: Mittelwert des Verlustes in Prozent der DOPAC-Konzentration durch unilaterale 6-OHDA-Behandlung im Vergleich mit der kontralateralen unbehandelten Hemisphäre \pm SEM.

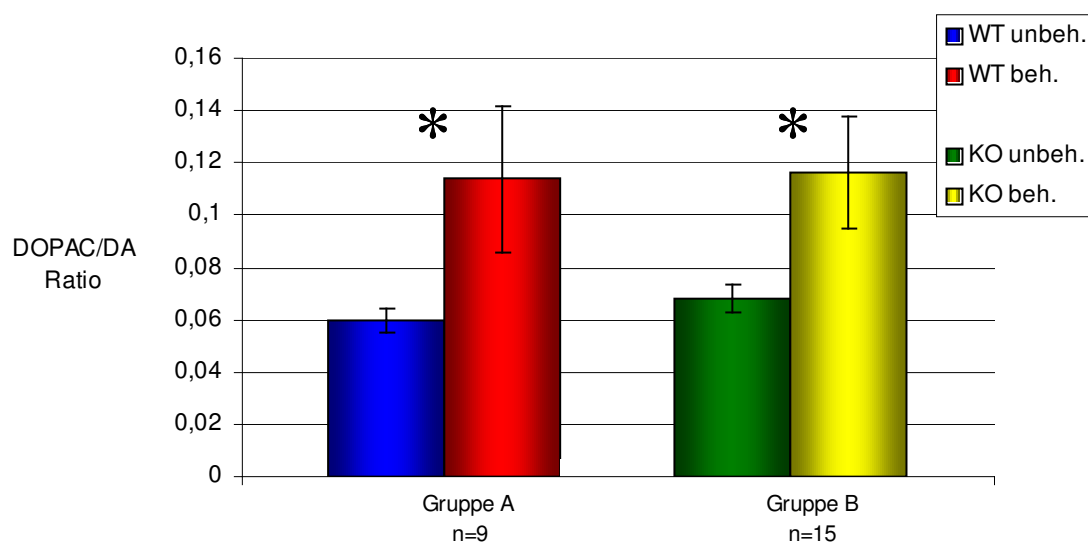


Abb. 3.19: Dopamin-Umsatz als DOPAC/DA-Ratio in unbehandelter und behandelter Hemisphäre in WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

3.3.2 TH-positive Neurone in SNc und VTA

Abb. 3.20 zeigt den Mittelwert der gezählten Zellen in der SNc beider Hemisphären \pm SEM und Abb. 3.22 den Mittelwert der gezählten Zellen in der VTA beider Hemisphären \pm SEM. Abb. 3.21 und Abb. 3.23 zeigen die prozentualen Verluste (Abb.

3.21 in der SNc, Abb. 3.23 in der VTA), welche die behandelte Hemisphäre durch 6-OHDA im Vergleich mit der unbehandelten Hemisphäre erlitten hat \pm SEM.

Sowohl in der SNc als auch in der VTA zeigen sich signifikante Unterschiede durch die 6-OHDA-Behandlung in der Anzahl TH-positiver Zellen verglichen mit der kontralateralen unbehandelten Seite in WT Mäusen bzw. KO Mäusen.

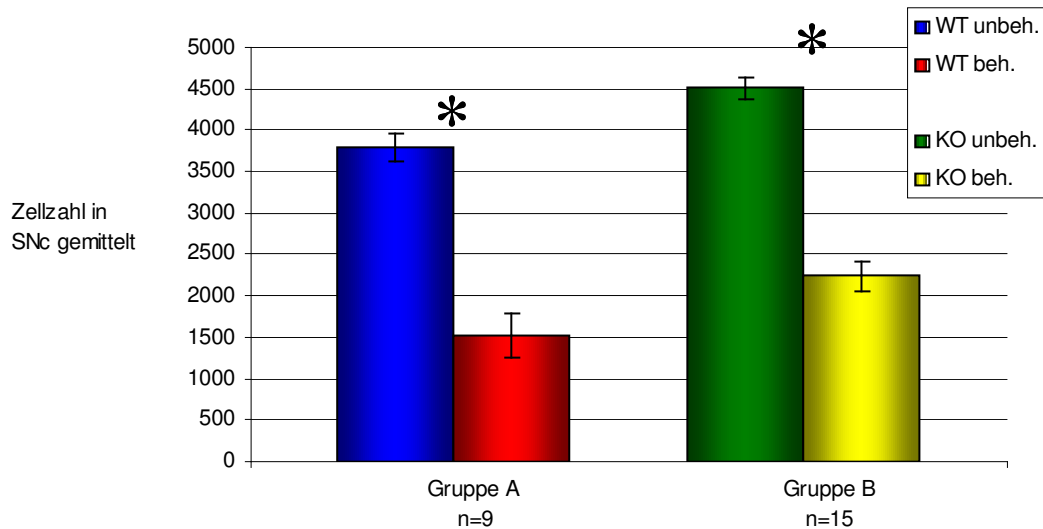


Abb. 3.20: Mittelwerte von TH-positiven Neurone in der SNc unbehandelter und behandelter Hemisphären in WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

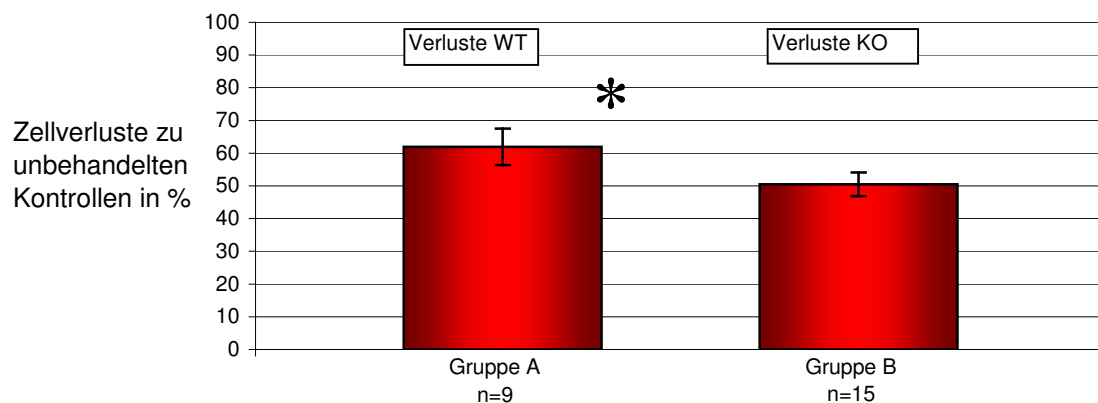


Abb. 3.21: Mittelwert der Verluste in SNc der behandelten Hemisphäre verglichen mit der kontralateralen unbehandelten Hemisphäre in Prozent angegeben \pm SEM.

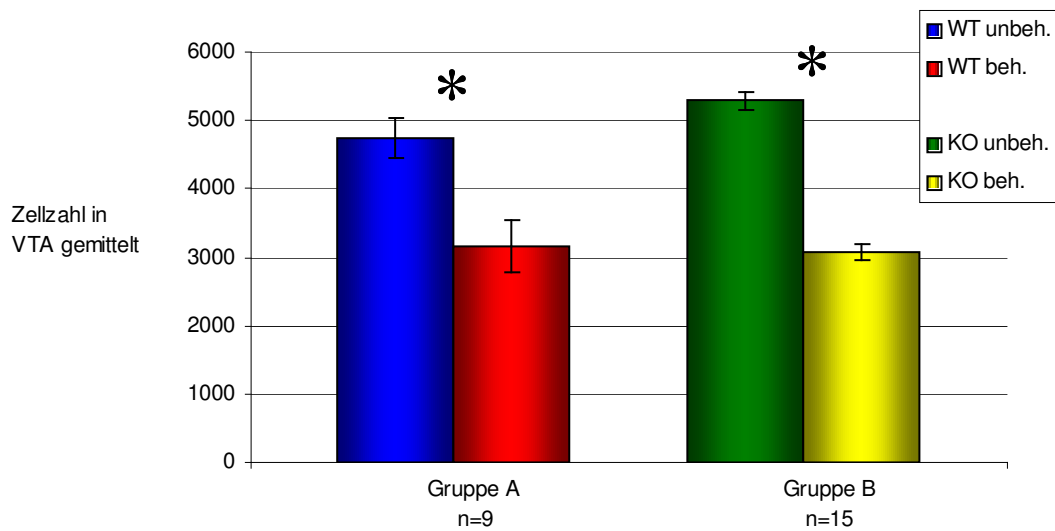


Abb. 3.22: Mittelwerte von TH-positiven Neurone in der VTA unbehandelter und behandelter Hemisphären in WT Mäusen bzw. KO Mäusen \pm SEM.

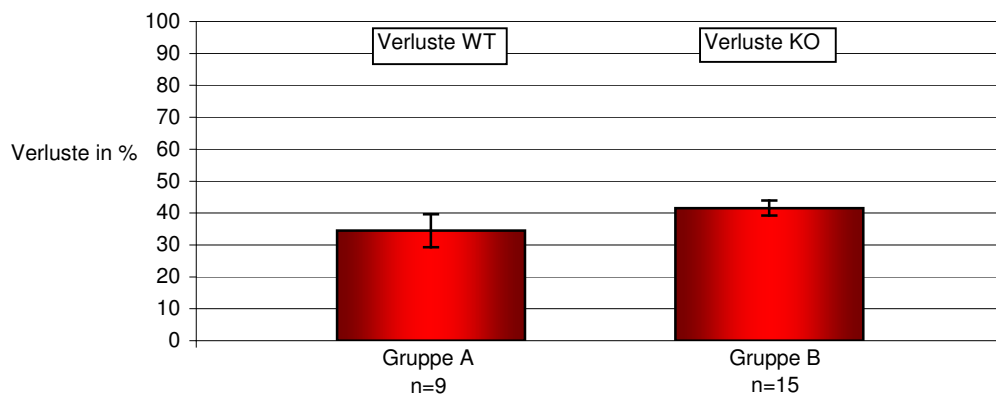


Abb. 3.23: Mittelwert der Prozentverluste in der VTA der behandelten Hemisphären verglichen mit der kontralateralen unbehandelten Hemisphären \pm SEM.

Wie aus Abb. 3.21 und Abb. 3.23 ersichtlich zeigt die Gruppe A im Vergleich mit der Gruppe B keinen signifikanten Unterschied in den Verlusten untergegangener TH-positiver Zellen in SNc und VTA der behandelten Hemisphäre.

Hier zwei Beispiele immunhistochemischer Färbungen.

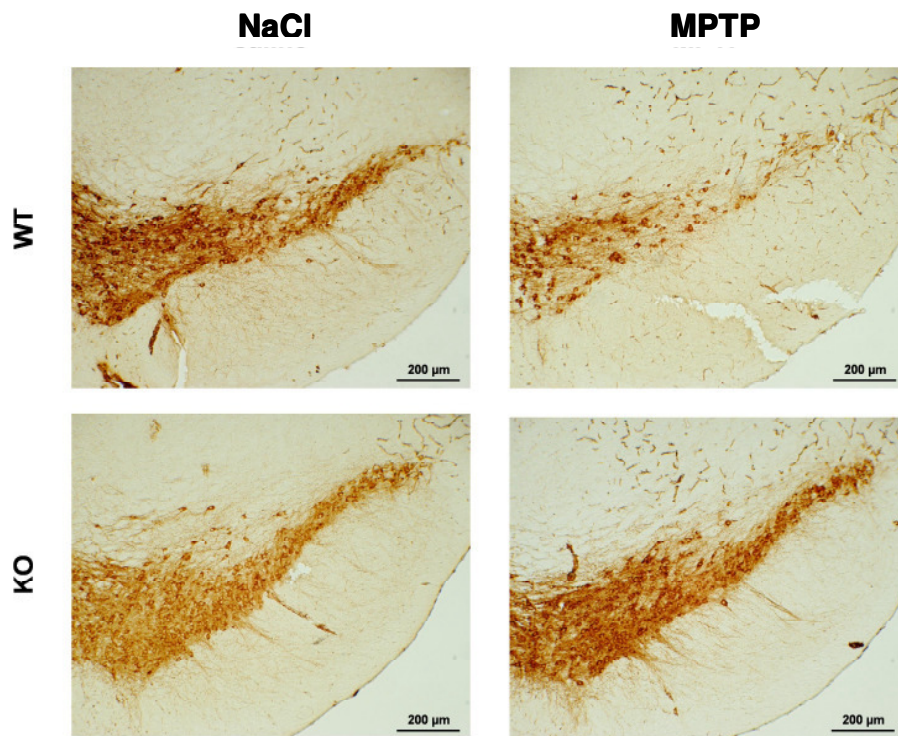


Abb.3.24: Hier zeigt sich deutlich sichtbar eine Reduktion von TH-positiven Zellen in der SNc von WT Mäusen nach MPTP-Behandlung.

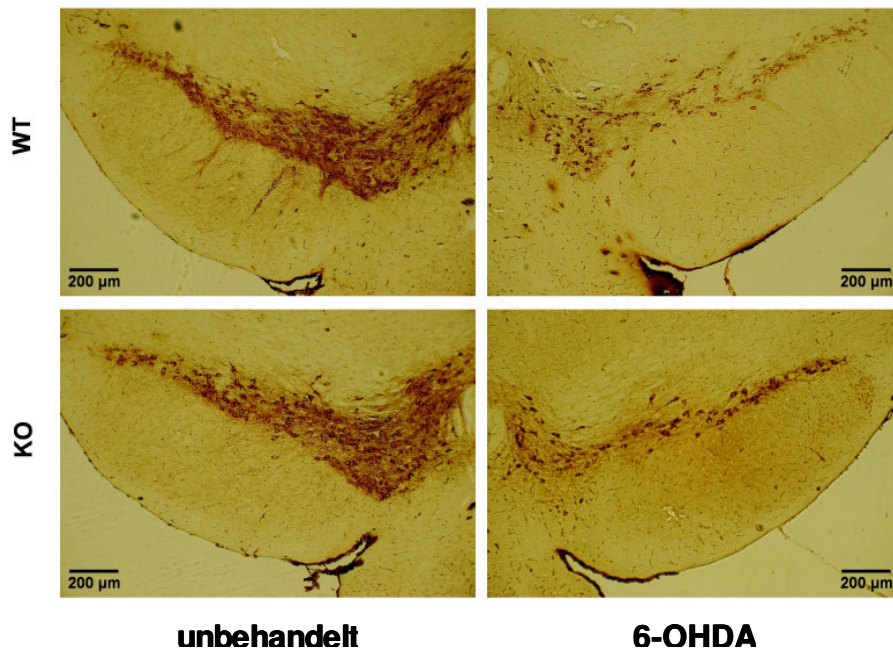


Abb.3.25: Nach unilateraler 6-OHDA Behandlung finden sich weniger TH-positive Zellen in der behandelten SNc in WT Mäusen vgl. mit KO Mäusen.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in der Literatur bereits beschriebene protektive Wirkung einer α -Syn Deletion im MPTP- Modell der Maus konnte bestätigt werden. Die Tiere zeigten einen signifikant geringeren Verlust der striatalen Dopamin Konzentration sowie einen signifikant geringeren Verlust TH-positiver Neurone in der SNc. Es wurde gezeigt, dass dieser protektive Effekt nicht auf einen veränderten MPTP-Metabolismus zurückzuführen ist, da die MPP^+ -Konzentration sowohl nach 120 min als auch 240 min in den WT und KO Tieren keine Unterschiede zeigt. Die Behandlung mit MPTP führte zu einer Erhöhung der freien Radikale. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den WT und KO Tieren hinsichtlich der Konzentration an freien Radikalen nach MPTP-Behandlung. Im 6-OHDA-Modell zeigte sich ebenfalls eine partielle Protektion der α -Syn KO Tiere gegen 6-OHDA.

4. Diskussion

Beim Morbus Parkinson kommt es pathophysiologisch zu einem Verlust dopaminerger Neurone der SN mit einem konsekutiven Verlust striatalen DA (vgl. auch 1.1 der Einleitung). Das α -Syn steht in einer zentralen Rolle der Parkinsonforschung, da Mutationen von α -Syn mit autosomal-dominant vererbten Formen des M. Parkinson assoziiert sind [Polymeropoulos, et al. 1997; Kruger, et al. 1998] und α -Syn einer der Hauptbestandteile der Lewy-Körper [Spillantini, et al. 1997] ist, die ein histopathologisches Kennzeichen des Morbus Parkinson sind (vgl. auch 1.6.1 der Einleitung).

Inzwischen konnten verschiedene Forschungsgruppen zeigen, dass Mäuse mit einer Deletion von α -Syn in einem klassischen Parkinson-Tiermodell, dem MPTP-Modell, weniger empfindlich sind als entsprechende Tiere vom WT [Dauer, et al. 2002; Schlüter, et al. 2003; Drolet, et al. 2004; Robertson, et al. 2004; Fornai, et al. 2005; Klivenyi, et al. 2006; Duka, et al. 2006]. Der Mechanismus von α -Syn in der MPTP-Toxizität konnte jedoch bisher nicht hinreichend geklärt werden (Tab.4 fasst alle Ergebnisse der bisherigen in-vivo Studien zu α -Syn mit verschiedenen Neurotoxinen zusammen).

Ein möglicher Mechanismus wurde von Klivenyi et al. [Klivenyi, et al. 2006] vorgeschlagen. Nach systemischer Gabe von 3-NP, einem Hydroxylradikale produzierenden Neurotoxin, welches nicht spezifisch für dopaminerge Zellen ist, zeigte sich eine erniedrigte Bildung von ROS im Striatum von KO Tieren verglichen mit WT Tieren. Daraus wurde gefolgert, dass α -Syn einen verstärkenden Einfluss auf die Radikalbildung hat und das Ergebnis wurde von Klivenyi et al. auch auf das MPTP-Modell übertragen, ohne jedoch hier den gleichen Effekt untersucht zu haben. Der Mechanismus, wie es schlussendlich zu dieser erhöhten Radikalbildung kommen soll, blieb allerdings unklar.

Von Bedeutung in diesem Zusammenhang könnten in-vitro Beobachtungen sein, die zeigen, dass eine Überexpression von WT oder mutiertem α -Syn durch ansteigende Konzentrationen an freien Radikalen den oxidativen Stress messbar erhöhen bzw. die

Zelle gegenüber oxidativem Stress sensibilisieren (Hsu, et al. 2000; Ostrerova-Golts, et al. 2000; Orth, et al. 2004).

Folgende Einschränkungen gilt es zu beachten: Erstens fehlen überzeugende in-vivo Daten für den verstärkenden Einfluss von α -Syn auf die Radikalbildung. Zweitens müssen die Mechanismen der Erhöhung freier Radikale von WT und mutiertem α -Syn nicht unbedingt identisch sein. Drittens weist der Mechanismus der Bildung von freien Radikalen von MPTP Unterschiede zu dem von 3-NP oder 6-OHDA auf (vgl. auch 1.4.1.2 und 1.4.2.2 der Einleitung).

In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen der Effekt von MPTP und 6-OHDA an einem weiteren α -Syn KO Stamm untersucht. Zum einen wurden die aus der Literatur bekannten Ergebnisse mit MPTP reproduziert (Dauer, et al. 2002; Schlüter, et al. 2003; Drolet, et al. 2004; Robertson, et al. 2004; Fornai, et al. 2005; Klivenyi, et al. 2006; Duka, et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt nicht auf einen Unterschied im MPTP- Metabolismus zurückzuführen ist, wodurch die KO Tiere einer geringeren Konzentration des aktiven Metaboliten, MPP^+ , ausgesetzt wären. In bereits publizierten Daten war dies schon eingeschränkt gezeigt worden (Dauer, et al. 2002; Drolet, et al. 2004; Klivenyi, et al. 2006), wobei die Untersuchungen auf die striatalen MPP^+ Konzentration nach 90 min (ca. eine biologische Halbwertszeit) [Schmidt & Ferger, 2001] beschränkt waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch nach 4 Stunden (ca. 2 Halbwertszeiten) die MPP^+ -Konzentration gemessen. Hier zeigte sich, dass es keine pharmakokinetischen Unterschiede bezüglich MPTP zwischen den KO und WT Tieren gibt und damit die striatale Ausschwemmung nicht durch eine α -Syn Deletion beeinflusst zu sein scheint.

Mit der Erweiterung auf ein weiteres Toxin, dem 6-OHDA, wurde der Einfluss von α -Syn in einem anderen Parkinsonmodell getestet. Die Ergebnisse sollten zusammen mit der indirekten Messung der Radikalproduktion nach MPTP-Gabe Aufschluss über die Rolle von α -Syn und freien Radikalen geben.

In der folgenden Tabelle findet sich eine Zusammenfassung aller bisheriger in-vivo Studien zu α -Syn und verschiedenen Neurotoxinen und gibt so eine Übersicht über die vorgeschlagenen Mechanismen der Toxizität von α -Syn.

Studie	Toxin	Protektion auf nigraler Ebene	Protektion auf Ebene striatalen DA	Vorgeschlagener Mechanismus der Protektion
Dauer, et al. 2002	MPTP Rotenon	Ja Nein	Ja Nein	“Prämitochondraler Komplex I“
Schlüter, et al. 2003	MPTP	Keine Angaben	Ja und Nein ^{1,3}	α -Syn Deletion ist nicht zwangsläufig protektiv ³
Drolet, et al. 2004	MPTP	Keine Angaben	Ja	α -Syn beeinflusst die Aufnahme von MPP ⁺ in die Speichervesikel
Robertson, et al. 2004	MPTP	Ja	Keine Angaben	Kompensatorischer Anstieg von β -Syn
Fornai, et al. 2005	MPTP	Ja	Ja ^{1,3}	α -Syn erhöht die Inhibition des UPS nach MPTP-Intoxikation ³
Klivenyi, et al. 2006	MPTP 3-NP Malonate	Ja Ja Ja	Ja Ja ² Ja ²	Ohne α -Syn reduziert sich die toxin-induzierte ROS-Konzentration in der Zelle
Duka, et al. 2006	MPTP	Keine Angaben	Ja	MPTP-induzierte Modulation der α -Syn Konzentration reguliert die Bildung von p-Tau
Vorliegende Arbeit	6-OHDA MPTP	Ja Ja	Nein Ja	Schädliche Effekte von α -Syn interferieren mit ROS, α -Syn ist kein „Radikal-enhancer“ per se.

Tab.4.: ¹Schlüter et al. (2003), fanden einen protektiven Mechanismus in α -Syn KO Mäusen jedoch nicht in einem Mäusestamm der eine spontane Deletion des Gens trägt. ²Es wurde nicht DA, sondern die striatale Läsionsgröße gemessen. ³In diesen Arbeiten wurden die gleichen Mäusestämme verwendet, jedoch ohne dass ein Unterschied zwischen beiden Stämmen in der letzten Arbeit beschrieben wurde (Fornai, et al. 2005).

4.1 MPTP-Intoxikation

4.1.1 Schädigung des nigrostriatalen Systems durch MPTP in α -Syn KO Tieren

Wie erwartet, führt die Behandlung von MPTP zu einer Läsion des nigrostriatalen Systems. Auf Ebene striataler Neurotransmitter zeigte sich 21 Tage nach der letzten Injektion (siehe Kap. 3.2.1), dass der Dopaminverlust in den α -Syn KO Mäusen (Gruppe 4) deutlich geringer ausfiel als in den WT Tieren. Der Dopaminverlust in den α -Syn KO Mäusen betrug 21,7% und war damit signifikant kleiner ($p < 0.005$) als in den α -Syn WT Mäusen mit 59,5% (Gruppe 2). Dabei ist die Höhe des Dopaminverlustes im erwarteten Bereich [Kurosaki, et al. 2004].

Auf nigraler Ebene, führte die Behandlung mit MPTP zu einer signifikanten Reduktion TH-positiver Zellen in den α -Syn WT Mäusen (von 4525 zu 3223,8) verglichen mit den α -Syn KO Mäusen (von 4441,6 zu 4233,2), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden NaCl behandelten Gruppen bestand. Der Zellverlust in den Wildmäusen entspricht den erwartenden Wert [Turmel, et al. 2001].

Prinzipiell kann eine veränderte Sensibilität auf rein pharmakodynamische oder pharmakokinetische Alterationen zurückzuführen sein. In der äußeren Membran der Mitochondrien ist die Monoaminoxidase MAO-B lokalisiert, welche das MPTP in seinen aktiven Metaboliten MPP^+ umwandelt [siehe Kap. 1.3.4]. Die Empfindlichkeit gegenüber der MPTP-Toxizität ist in Mäusen bekanntlich deutlich geringer ausgeprägt als in Affen und in Ratten fehlt sie sogar vollständig. Eine unterschiedlich hohe Aktivität der endothelialen MAO-B und damit eine vorzeitige Umsetzung von MPTP ist hierfür verantwortlich [siehe Kap 1.4.2.3]. Aber auch innerhalb der Spezies Maus reagieren verschiedene Stämme und Züchtungen eines Stammes mit unterschiedlich starker Aktivität der endothelialen Monoaminoxidase unterschiedlich auf das Toxin [Heikkila, et al. 1985; Giovanni, et al. 1991; Kalaria, et al. 1987; Riachi, et al. 1991]. Eine Deletion, welche die Aktivität der MAO-B beeinflusst, würde folglich zu einer verringerten Umsetzung zu MPP^+ führen, was in einer geringeren Toxizität münden würde. Wie weiter unten geschildert [vgl. Kap 4.1.2], wurde dies als Ursache ausgeschlossen.

Weitere Möglichkeiten sind die DAT und VMAT2 Aktivität, die ebenfalls ganz maßgeblich die MPP^+ Toxizität beeinflussen [vgl. Kap. 1.4.1]. Auch wenn dies in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, so ist es unwahrscheinlich, dass die verringerte

Sensibilität von α -Syn KO Mäusen allein auf eine verminderte Aufnahme des Toxins in die dopaminerge Zelle zurückzuführen ist. Dieser Effekt wurde inzwischen unabhängig voneinander an mehreren unterschiedlichen α -Syn KO Stämmen getestet (Dauer, et al. 2002; Drolet, et al. 2004; Robertson, et al. 2004; Fornai, et al. 2005; Klivenyi, et al. 2006; Duka, et al. 2006). In 3 unterschiedlichen Stämmen wurde unabhängig voneinander kein Unterschied in der Monoamintransporterfunktionen bzw. -quantität festgestellt (Dauer, et al. 2002; Schlüter, et al. 2003; Drolet, et al. 2004). Es ist daher eher wahrscheinlich, dass der Effekt wirklich auf der fehlenden Funktion bzw. einer fehlenden schädigenden Funktion zurückzuführen ist.

Die Höhe sowohl des Dopaminverlustes als auch Verlustes TH-positiver Zellen in den WT Tieren ist im erwarteten Bereich [Kurosaki, et al. 2004; Turmel, et al. 2001]. Wie bereits geschrieben reproduziert die vorliegende Arbeit damit die in der Literatur berichteten Ergebnisse.

Die Erstveröffentlichung zu diesem Thema kam 2002 von Dauer et al. in welcher die Autoren das akute MPTP-Modell (4 x 20 mg/kg MPTP in zweistündigem Abstand), das zu einem eher nekrotischen Zellverlust führt, als auch das subchronische MPTP-Modell, welches eher zu einem apoptotischen Zelltod führt verwendeten. Die Tiere wurden hier 7 Tage nach der letzten Gabe im akuten Modell bzw. 21 Tage nach der letzten Injektion im subchronischen Modell getötet. In beiden Modellen waren die Tiere ohne α -Syn sowohl auf striataler als auch nigraler Ebene vollständig vor MPTP geschützt.

Da der Komplex I-Inhibitor Rotenon die α -Syn KO Mäuse in gleichen Maße schädigte und „down-stream“ einer Komplex I-Inhibition die Effekte beider MPTP-Modelle bezogen auf den Zelltodmechanismus unterschiedlich waren, schlossen die Autoren, dass der protektive Effekt vor einer Hemmung der Atmungskette liegen muss. Ein „prämitochondraler Komplex“ wurde hierfür verantwortlich gemacht.

In der Arbeit von Schlüter et al. [2003] wurden α -Syn WT und zwei unterschiedliche α -Syn KO Stämme im akuten MPTP-Modell untersucht. Ein Stamm der α -Syn Tiere wurde durch homologe Rekombination erzeugt und gezüchtet, der andere trug eine spontane Deletion des α -Syn Gens. Sie zeigten die gleichen Eigenschaften wie die Tiere von Abeliovich et al. [Abeliovich, Schmitz, et al. 2000]. Alle Tiere wurden 5 Tage nach der letzten Behandlung getötet und es wurden die striatalen Neurotransmitterkonzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse zeigten einen dosisabhängigen Verlust an Dopamin und DOPAC im Striatum bei α -Syn KO Mäusen

und α -Syn WT Mäusen. Der Verlust an Dopamin im Striatum der α -Syn WT Mäuse war bei niedrigen Dosen MPTP bis 2x20 mg/kg signifikant größer als in α -Syn KO Mäusen. Insgesamt fiel hier der protektive Effekt eher moderat aus. Interessanterweise trat dieser Effekt jedoch nur bei einem der beiden KO Stämme auf. Die Tiere des C57/Bl6S α -Syn KO Mäusestammes mit einer spontanen Deletion waren nicht vor dem Dopaminverlust im Striatum und somit gegenüber der Intoxikation geschützt, was auf die Beteiligung anderer Faktoren in-vivo hindeutet und das Fehlen des α -Syn nicht allein für den protektiven Effekt verantwortlich sein kann [Schluter, et al. 2003].

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit sind noch besonders die Studien von Fornai et al. (2005) und Klivenyi et al. (2006) interessant, da diese Hinweise auf einen möglichen Mechanismus zur Protektion liefern.

Die Arbeit von Fornai et al. ist in einem weiteren Punkt sehr bemerkenswert, da sie ein neues Modell der MPTP-Applikation zeigt. Das chronische MPTP-Modell mit einer kontinuierlichen Gabe von 30 mg/kg pro Tag über 4 Wochen mittels kleiner, osmotischer Pumpen [Fornai, et al. 2005]. Hierbei kam es zu einem wesentlich deutlicheren Zellverlust (und konsekutiv auch striatalem DA-Verlust) als im subchronischen Modell ohne Anzeichen einer partiellen Erholung (wie dies im subchronischen Modell der Fall ist), sondern auch zur Entwicklung von α -Syn positiven Einschlusskörperchen. Somit wäre dieses Modell das bisher einzige MPTP-Modell, das Lewy-Körper ähnliche Aggregate produziert. Kritisch anzumerken bleibt, dass das Modell von Fornai et al, bisher nicht repliziert wurde. Während jedoch die chronische Infusion von MPTP in den α -Syn WT Tieren zu einem fast 80%igen Verlust striatalen DA sowie dopaminerger Zellen der SN führte, blieben die Verluste in den α -Syn KO Tieren nicht signifikant. Die Autoren zeigten, dass die Hemmung des UPS in den α -Syn KO Tieren signifikant niedriger war und folgern, dass der schädigende Effekt des α -Syn durch die Hemmung des UPS hervorgerufen wird. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt die Hemmung des UPS zu α -Syn positiven Einschlusskörperchen [Rideout, et al. 2001](vgl. auch Kap. 1.5.1 der Einleitung). Diese Aggregate hemmen wiederum das UPS [Glickmann & Ciechanover, 2002]. Dies ist interessant, da auch 6-OHDA zu einer Aggregation von α -Syn führt [Ischiropoulos and Beckmann, 2003 Alves da Costa, et al. 2002, 2006] und die 6-OHDA-Toxizität durch eine UPS-Inhibition verstärkt wird [Elkon, et al. 2002].

Klivenyi et al. behandelten α -Syn WT und α -Syn KO Mäuse (gleicher Stamm α -Syn KO Mäuse wie in der Arbeit von Abeliovich, et al. 2000) mit 3x20 mg/kg im Abstand

von jeweils 2 h i.p. und töteten die Tiere 7 Tage nach der letzten Injektion. Die nachfolgenden Messungen ergaben einen signifikant höheren Dopaminverlust ($p < 0.002$) von 70% in den WT Mäusen im Vergleich zu 41% in den KO Mäusen. Auf striataler Ebene führte die MPTP-Behandlung zu einem ca. 50%igen bzw. 33%igen Verlust dopaminerger Zellen in der SN von α -Syn WT bzw. α -Syn KO Mäusen. Wie bereits auf Seite 75 der Diskussion beschrieben, schlossen die Autoren von Ergebnissen mit 3-NP, dass der schädigende Einfluss von α -Syn mit dessen Fähigkeit, die Radikalbildung zu erhöhen, zusammenhängt. Ein Beweis oder Mechanismus hierfür konnten sie jedoch nicht aufweisen.

Allerdings schließen sich die vorgeschlagenen Mechanismen gegenseitig nicht aus, da das UPS auch durch oxidativen Stress gehemmt wird [Glickmann & Ciechanover, 2002]. In der vorliegenden Arbeit sollte aber nun geklärt werden, ob die Radikalbildung nach MPTP-Gabe in den α -Syn KO Tieren tatsächlich verringert ist.

4.1.2 Entwicklung von freien Radikalen nach MPTP in α -Syn KO Tieren

Zunächst wurde die Konzentration vom MPP^+ (der aktive Metabolit des MPTP) im Striatum gemessen. Anschließend wurde als Marker für die Radikalproduktion der Quotient aus 2,3 DHBA/NaSa bestimmt (siehe Kap. 2.4.3.) [Ferber, et al. 2001]. MPTP schädigt durch seinen aktiven Metaboliten „ MPP^+ “ die Zelle auf zwei Wegen und führt so zu einer Radikalerhöhung. MPP^+ inhibiert zum einen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und führt zu einem ATP-Verlust und einem Anstieg von freien Radikalen (vgl. auch Kap. 1.4.1.2 der Einleitung) [Schmidt and Ferger, 2001]. Zum anderen wird MPP^+ durch den VMAT2 in die DA Vesikel aufgenommen, wodurch es zu einer Umverteilung von vesikulärem zu zytosolischen DA führt, welches wiederum die Bildung von freien Radikalen erzeugt und zum Zelltod führt (Lotharius and O'Malley, 2000). Interessanterweise führt auch WT α -Syn zu einer solchen Umverteilung von vesikulärem DA (Hashimoto, et al. 1999; Volles, et al. 2002; Kim, et al. 2002), und mutiertes α -Syn führt zu einer weiteren Steigerung von zytosolischem DA (Tabrizi, et al. 2000; Volles, et al. 2002; Lotharius, et al. 2002; Orth, et al. 2004). Daher schien es plausibel, dass eine α -Syn Deletion zu einer niedrigeren zytosolischen DA Konzentration führt und damit zu einer niedrigeren Radikalbildung.

Zu den frühen Zeitpunkten liegen die gemessenen striatalen MPP^+ -Konzentration im Bereich der bereits publizierten Daten [Dauer, et al. 2002; Drolet, et al. 2004;

Klivenyi, et al. 2006]. Die α -Syn WT Mäuse und α -Syn KO Mäuse zeigten 90 min nach Applikation in den Daten von Dauer et al. gleiche striatale MPP⁺ Konzentrationen. Messungen zu einem späteren Zeitpunkt finden sich in den Veröffentlichungen von Dauer et al. und Drolet et al. jedoch nicht. Auch nach 240 min zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Werte sind etwa 50% niedriger als nach 120 min, was der biologischen Halbwertszeit von 90 min beim MPTP entspricht [Schmidt & Ferger, 2001]. Es konnte eine Radikalbildung gemessen werden, die durch einen Anstieg des Quotienten aus 2,3 DHBA und NaSa angezeigt wurde (nach 2h WT: 5.16 ± 0.94 , KO: 4.00 ± 0.74 ; nach 4h WT: 6.57 ± 1.27 , KO: 6.55 ± 0.61). Damit lagen die Werte im erwarteten Bereich [Schmidt & Ferger, 2001]. Allerdings zeigte sich kein Einfluss der α -Syn-Deletion auf die Radikalbildung. Somit konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden.

Welche Rolle spielt daher α -Syn in der MPTP vermittelten Toxizität ?

4.1.3 Die Rolle von α -Syn im MPTP-Modell

Wie in Kap. 4.1.2 beschrieben, ist ein neben der Bildung von Radikalen die Hemmung der Atmungskette mit daraus resultierenden Energiemangel und Zusammenbruch lebensnotwendiger Funktionen in der Zelle, einer der Mechanismen der Toxizität von MPTP.

Wie schon von Dauer et al. Erwähnt, wurde ein „prämitochondrialer Mechanismus“ vorgeschlagen, da das Rotenon, ein lipophiler und damit nicht DAT und VMAT abhängiger Komplex I-Inhibitor, toxisch auf die α -Syn defizitären DA-Neurone wirkt [Dauer, et al. 2002].

Auch Drolet et al. berichteten von einem „prämitochondrialem Mechanismus“ auf Grund einer unterschiedlichen Sequestrierung von MPP⁺ [Drolet, et al. 2004]. Eine α -Syn Deletion schützt jedoch in-vivo auch gegen andere mitochondriale Toxine, wie etwa 3-NP und Malonat [Klivenyi, et al. 2006], Die Autoren bemerken zudem treffend, dass wenn eine verminderte Komplex I-Inhibition in den α -Syn KO Tieren von Drolet et al. [Drolet, et al. 2004] vorliegen würde, die α -Syn KO Tiere keine erhöhten Laktatspiegel hätten aufweisen dürfen. Zwar waren Laktat-Konzentrationen direkt nach MPTP-Applikation in α -Syn KO Mäusen geringer [Dauer, et al. 2002], die gemessenen Werte 3 Wochen nach 5 wöchiger chronischer MPTP-Behandlung zeigten jedoch höhere Werte in den α -Syn KO Mäusen [Drolet, et al. 2004].

Wie unter 4.1.1 dargelegt, sehen Klivenyi et al. die Ursache für den Schutz von α -Syn KO Mäusen eher in der verminderten ROS-Produktion. Da diese einen um etwa 18 % ($p=0.004$) geringeren Dopaminvorrat in SNc und VTA besitzen [Abeliovich, Schmitz, et al. 2000], kommt es bei MPTP-Gabe zu einer geringeren Dopaminfreisetzung und damit zur Reduzierung von oxidativem Stress. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied in der gemessenen Konzentration von Hydroxylradikalen nach MPTP-Gabe gemessen werden. So besteht auf dieser Ebene kein Anhaltspunkt dafür, dass α -Syn den oxidativen Stress in der Zelle nach MPTP-Intoxikation erhöht und daher auch nicht dass α -Syn durch Erhöhung des oxidativen Stresses die MPTP-Toxizität erhöht. Diese Hypothese ist somit widerlegt. Dies ist ein sehr wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Auf der anderen Seite muss festgehalten werden, dass auch diese Arbeit nicht eindeutig den schädigenden Einfluss von α -Syn zeigen konnte. Welche Erkenntnisse können jedoch aus den Untersuchungen mit 6-OHDA gewonnen werden?

4.2 6-OHDA-Behandlung

4.2.1 Schädigung des nigrostriatalen Systems durch 6-OHDA in α -Syn KO Tieren

Auf Transmitterebene ergeben sich nach unilateraler Behandlung mit 6-OHDA folgende Ergebnisse: In beiden Gruppen sind die Dopaminverluste signifikant hoch (70% in WT Mäusen und 60% in KO Mäusen). Die beiden Gruppen nach MPTP- oder NaCl-Behandlungen (WT und KO Mäuse) zeigen aber im Vergleich keinen signifikanten Unterschied. Gleiches gilt für den Verlust an DOPAC (62% in WT Mäusen und 52% in KO Mäusen). Interessanterweise zeigen beide Gruppen einen kompensatorischen Anstieg der DOPAC/DA Ratio in der geschädigten Hemisphäre ohne einen hier einen Unterschied in beiden Gruppen zu erkennen.

Auf der Zellzahlebene fallen in beiden Gruppen die Verluste in der SNc in der geschädigten Hemisphäre verglichen mit der ungeschädigten Hemisphäre deutlich aus. Allerdings sind diese mit 62 % in WT Mäusen signifikant höher als in den KO Mäusen mit 50% Verlusten an dopaminergen Zellen in der SNc. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die WT Tiere im Gegensatz zu den KO Tieren auch in der unbehandelten Hemisphäre Verluste erlitten haben.

Geht man von den Zellzahlen der SNc von WT Tieren, die mit i.p. NaCl behandelt wurden aus, dann hat die WT Gruppe auf der unbehandelten Hemisphäre Verluste von etwa 21,7 % und auf der behandelten Hemisphäre Verluste von etwa 57,9 % erlitten. Die KO Tiere erlitten auf der unbehandelten Seite verglichen mit den i.p. NaCl behandelten Tieren keinen Verlust, auf der behandelten Seite Verluste in Höhe von 38,8 % und damit deutlich weniger als der WT.

Auch die Verluste in der VTA sind hier in beiden Gruppen signifikant hoch, jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der SNc ohne signifikanten Unterschied.

Obwohl das 6-OHDA-Modell an Mäusen angewandt wird, ist es in Bezug auf Zeitverlauf der Degeneration, Größenordnung und Verhaltensdefizite weniger gut charakterisiert als in der Ratte. Trotzdem liegen die Ergebnisse der WT Tiere in dem Bereich aus früheren Versuchen in unserem Labor [Alvarez-Fischer D, et al. 2008], zum anderen in einem Bereich, den man aus der Literatur erwartet [Iwata, et al. 2004; Lundblad, et al. 2004].

Die VTA besitzt dopaminerge mesostriatale, mesolimbische, mesocorticale Efferenzen [siehe Kap. 1.2.3]. Die VTA nimmt v.a. deshalb weniger Schaden, da das Toxin nur in die striatalen Efferenzen des dorsalen Striatums und nicht in die mesolimbischen Efferenzen, die v.a. in den Nucleus accumbens (NAc) ziehen oder mesocorticalen Efferenzen des frontalen Kortex gespritzt wird. Damit kommt es zur geringeren Toxinaufnahme.

Unklar ist, wie 6-OHDA die SNc der anderen Hemisphäre lädiert. Eine Möglichkeit wäre die Diffusion eines Teils des 6-OHDA in die andere Hemisphäre. Dadurch könnte ein Teil der dort endenden nigrostriatalen Fasern zum retrograden Zelluntergang führen. Wahrscheinlicher ist aber eine Schädigung über Kommissurfasern. In einem Versuch an Ratten konnte gezeigt werden, dass die unilaterale intrastriatale Injektion von 6-OHDA zu einem Verlust an markierten Stellen der Dopamin-Wiederaufnahme in ipsi- und kontralateraler SNc und VTA führt, aber nur im ipsilateralen und nicht kontralateralen Striatum. Die nigrostriatalen Fasern scheinen damit in beide Hemisphären zu projizieren und so eine Verbindung herzustellen [Berger, et al. 1991].

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass α -Syn KO Mäuse besser gegen das Toxin geschützt sind. Ersichtlich ist ein deutlicher Trend auf Transmitterebene und ein signifikanter Effekt ($p < 0.05$) auf der Zellebene. Daher muss aus diesen Daten geschlossen werden, dass α -Syn auch die Toxizität gegenüber 6-OHDA erhöht.

4.2.2 Die Rolle von α -Syn im 6-OHDA-Modell

Wie bereits unter 4.1.3 diskutiert, schützt eine α -Syn Deletion auch gegen andere mitochondriale Toxine wie 3-NP und Malonat [Klivenyi, et al. 2006]. Es wurde in diesem Kapitel auch dargestellt, weshalb man am ehesten von einer erhöhten Bildung freier Radikale in den WT Tieren, als Ursache der unterschiedlichen Vulnerabilität ausging.

Diese Versuche wurden allerdings mit dem für DA-Neurone unspezifischen Toxin 3-NP durchgeführt und die Ergebnisse bezüglich ihrer Spezifität daher in Frage zu stellen.

Die Ergebnisse mit 6-OHDA aus der vorliegenden Arbeit unterstützen jedoch die Vermutung, dass es einen verstärkten Effekt oder sogar auch eine verstärkte Bildung von freien Radikalen in Anwesenheit von α -Syn gibt, auch wenn, wie in Kap. 4.1.2 besprochen, die Ergebnisse hinsichtlich der Radikalbildung nach MPTP-Gabe nicht für eine einfache radikal erhöhende Eigenschaft von α -Syn sprechen.

Geht man einen Schritt zurück und fragt sich, wie α -Syn zumindest unter bestimmten Umständen die Bildung freier Radikale erhöhen könnte, lassen einige neuere Studien auf einen interessanten Mechanismus schließen. Es ist gut etabliert, dass oxidativer Stress und 6-OHDA die Aggregation von α -Syn fördern [siehe Kap.1.6.5.6] [Ischiropoulos and Beckmann, 2003; Alves da Costa, et al. 2002, 2006]. Weitere Studien zeigen, dass aggregiertes, missgefaltetes und oxidiertes α -Syn von sterbenden DA-Neuronen abgegeben und sezerniert wird und die ROS-Produktion in der Mikroglia steigert [Zhang, et al. 2005, Thomas, et al. 2007]. Dies wäre ein sehr plausibler Mechanismus zu einer radikalsteigernden Eigenschaft von α -Syn unter bestimmten Umständen.

Es ist ebenso denkbar - und diese beiden Mechanismen schließen sich nicht gegenseitig aus -, dass α -Syn zwar nicht den oxidativen Stress erhöht, jedoch seine Auswirkungen auf die Zelle. Oxidativer Stress und 6-OHDA fördern die Aggregation von α -Syn [Ischiropoulos and Beckmann, 2003 Alves da Costa, et al. 2002, 2006]. Aggregiertes α -Syn führt zu einer Hemmung der UPS Aktivität [vgl. auch Kap. 1.5.1]. Ebenso zeigten mutantes α -Syn exprimierende Zellen eine Abnahme in der UPS Aktivität in einem nicht zellschädigendem Ausmaß. Eine subtoxische Gabe eines Proteasom-Inhibitors wirkte auf diese Zellen toxisch [Tanaka, et al. 2001]. Ein potenter Inhibitor des UPS ist das 6-OHDA, welches in-vitro das Proteasom

dosisabhängig inhibiert. Durch die Gabe von Antioxidantien konnte dieser Effekt verhindert werden [Alves da Costa, et al. 2006].

In-vitro wurde durch DA induzierten Stress ein Absinken der UPS-Aktivität gemessen [Keller, et al. 2000]. Die Hemmung wird anscheinend über Oxidierungsprozesse vermittelt, über die 6-OHDA die Konzentration von Ubiquitin-konjugierten Proteinen erhöht. Durch Oxidierungsprozesse und Ubiquitin-konjugierte Proteine wird die Degradierungsrate von Proteinen durch das 6-OHDA beschleunigt. Diese kann durch Proteasom-Hemmer reduziert werden, wodurch die 6-OHDA-Toxizität in der Zelle gesteigert wird [Elkon, Melamed, et al. 2001].

Durch UPS-Hemmung wird auch die Degradierung von α -Syn gehemmt. Durch die resultierende Anreicherung wird die Aggregation von α -Syn unter anderem auch durch die oxidierenden Eigenschaften des 6-OHDA direkt gefördert, da oxidiertes α -Syn sich leichter ablagert [Hashimoto, et al. 1999]. Ein Ausfall des UPS und oxidativer Stress in Kombination sind maßgeblich an der Aggregation von α -Syn beteiligt [Davies, 2001].

Vor allem geschieht dies in eisenhaltigen Zellen wie z.B in der SN [Ostrerova-Golts, Petrucelli, et al. 2000; Sofic, Riederer, et al. 1988]. Freies Eisen scheint in der Produktion von ROS als Katalysator in der Fenton-Reaktion eine entscheidende Rolle zu spielen. Im Zusammenhang mit 6-OHDA konnte ein Eisenanstieg in der SNC gemessen und die Toxizität von 6-OHDA in-vivo durch Eisenchelatoren gemindert werden [He, et al. 1996; Ben Shachar, et al. 1991].

Die Folge sind Bildung von Ubiquitin- und Syn-immunopositiven Einschlüssen in der Zelle [Rideout, Larsen, et al. 2001; Rideout, et al. 2004; McNaught, et al. 2004].

An der Wirkung des 6-OHDA auf das UPS, welches in Verbindung mit dem α -Syn eine große Rolle in der 6-OHDA-Toxizität zu spielen scheint, lassen sich auch Unterschiede zur MPTP-Toxizität festhalten. Interessanterweise fielen diese Effekte in-vitro bei MPP⁺ und 6-OHDA unterschiedlich aus. MPP⁺ führte in-vitro im Gegensatz zu 6-OHDA nicht in gleichem Maße zur Degradierung von endogenen und rekombinanten α -Syn und somit zu dessen Aggregation. Nur in hohen MPP⁺-Konzentrationen war eine Hemmung des UPS und Aggregation von α -Syn zu beobachten. Die UPS-Hemmung konnte im Gegensatz zu 6-OHDA durch die Gabe von Antioxidantien nicht aufgehoben werden [Alves da Costa, et al. 2006]. Dass oxidativer Stress in geringer Konzentration nicht das UPS hemmt [Ding, et al. 2003], stimmt mit der Beobachtung überein, dass nur durch chronische MPTP-Behandlung in α -Syn WT Mäusen das UPS erfolgreich gehemmt wurde. Im Falle von sporadischen

MPTP-Behandlungen kam es zu einer schnellen Erholung der UPS-Aktivität [Fornai, et al. 2005]. Nun sind die α -Syn KO Tiere aber nicht nur nach chronischer Gabe von MPTP über Alzet Pumpen geschützt, sondern wie u.a. in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, auch nach subchronischer Gabe. Es ist denkbar, dass eine kurzfristige Einschränkung der UPS-Aktivität bereits ausreicht, um zu einer erhöhten Sensibilität zu führen. Lassen sich auch andere Schlüsse aus der Zusammenschau aller Ergebnisse ziehen?

4.3 Mechanismen der Zellschädigung von α -Syn

Es scheint nützlich, an dieser Stelle noch einmal die Ergebnisse zusammenzufassen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass

- a) eine Deletion von α -Syn gegen eine Intoxikation mit MPTP schützt
- b) dieser Schutz auch in einem weiteren Modell, dem 6-OHDA-Modell, partiell besteht
- c) sich der Schutz im MPTP-Modell nicht auf eine veränderte Pharmakokinetik des MPTP selbst zurückführen lässt
- d) der Schutz gegen MPTP nicht auf eine verringerte Radikalbildung zurückzuführen ist.

Vor allem der letzte Punkt scheint das Bild zunächst komplexer zu machen, da die Versuche mit 6-OHDA und Studien aus der Literatur dem α -Syn Radikal erhöhende Eigenschaften zuschreiben (vgl. Hsu, et al. 2000; Ostrerova-Golts, et al. 2000; Orth, et al. 2004; Klivenyi, et al. 2006).

Da jedoch MPTP weit weniger Hydroxylradikale erzeugt als 3-NP und 6-OHDA [Schmidt & Ferger, 2001; Henze, et al. 2005], könnte es sein, dass die Effekte von α -Syn auf freie Radikale möglicherweise direkt mit dem Ausmaß des induzierten oxidativen Stress zusammenhängen. Passend dazu wurde gezeigt, dass eine Überexpression von WT α -Syn MN9D Zellen (eine DA Zelllinie), gegen MPP⁺ schützt jedoch nicht gegen 6-OHDA [Zhou, et al. 2006]. Neben dem Ausmaß der Bildung von Radikalen sind die Effekte von 6-OHDA und MPTP auf die α -Syn Expression gegensätzlich. Während MPTP die α -Syn mRNA bzw. Proteinspiegel einerseits durch erhöhte Synthese [Kowall, et al. 2000; Kuhn, et al. 2003; Purisai, et al. 2005], andererseits durch verminderten Abbau erhöht [Meredith, et al. 2002; Duka, et al.

2006], senkt 6-OHDA die α -Syn mRNA Expression [Kholodilov, et al. 1999; Zeng, et al. 2002]. Schließlich fördert 6-OHDA im Gegensatz zu MPTP die Aggregation von α -Syn in-vitro [Alves da Costa, et al. 2006]. Die Aggregation von α -Syn wiederum kann, wie weiter oben beschrieben, zu einer verstärkten Radikalbildung in der Mikroglia führen [Zhang, et al. 2005; Thomas, et al. 2007]. Daraus lässt sich ableiten, dass radikal erhöhende Eigenschaften von α -Syn abhängig vom Parkinsonmodell und dem applizierten Neurotoxin sein könnten. Es existieren in-vitro Studien, die zeigen, dass Zellen gegenüber einem milden oxidativen Stress durch WT α -Syn geschützt sind [Quilty, et al. 2006], sowie in-vitro und in-vivo Studien, die einen schützenden Effekt gegenüber Paraquat (ein Pestizid) -induzierten oxidativen Stress zeigen [Choi, et al. 2006].

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, müssten weitere Versuche in anderen Parkinsonmodellen durchgeführt werden, z.B. dem Reserpin-Modell, aber auch dem angesprochenem Paraquat-Modell, und in all diesen Modellen die Höhe der gebildeten Radikale bestimmt werden. Die Idee jedoch, dass ein physiologisches Niveau einer α -Syn Expression das Überleben von Zellen fördert [Cookson, 2006; Quilty, et al. 2006], wohingegen Mutationen des α -Syn ebenso die Über-Expression von α -Syn mit pathologischen Eigenschaften zusammenhängen, scheint plausibel und wurde in der Literatur beschrieben (Singleton, et al. 2003; Cookson, et al. 2006; Duka, et al. 2006). Dieses wäre auch therapeutisch von großer Bedeutung, weil daraus folgern würde, dass die Menge von α -Syn auf einem bestimmten Niveau zu halten ist und widerspricht Therapieansätzen, die eine komplette Inhibition der Proteinfunktion nahelegen (Lansbury and Lashuel, 2006).

Ebenso plausibel – und beide Ansätze schließen sich nicht aus – scheint eine Involvierung des UPS in die α -Syn-vermittelte Toxizität. Eine Kompromittierung des UPS könnte in beiden Modellen eine Rolle spielen. Tatsächlich weisen einige Publikationen in diese Richtung. Fornai et al. konnten zeigen, dass das UPS eine entscheidende Rolle in der verminderten Vulnerabilität der α -Syn KO Mäuse zu spielen scheint [Fornai, et al. 2005]. Zwar scheint die Ausprägung und Dauer der UPS Inaktivierung im Striatum von der Applikationsform abhängig zu sein, da sich zeigte, dass eine chronische Applikation durch kontinuierliche Infusion über eine Minipumpe zu einer lang anhaltenden teilweisen Inaktivierung des UPS führt, wohingegen es bei einer diskontinuierlichen Applikation – wie in der vorliegenden Arbeit – nur zu einem

kurzzeitigen Abfall der UPS Aktivität mit anschließend kompensatorischer Überaktivität kommt [Fornai, et al. 2005]. Dennoch führt auch eine diskontinuierliche Applikation von MPTP zu einer Degeneration des nigrostriatalen Systems und einer Inhibierung des UPS [Heikkila, et al. 1984a; Javitch, et al. 1985; Nicklas, et al. 1985; Heikkila, et al. 1984b].

Unter Berücksichtigung der Arbeit von Fornai et al. führen diese Überlegungen zu dem Schluss, dass es in Anwesenheit von α -Syn zu einer verstärkten Hemmung des UPS kommt und somit die Toxizität von MPTP und 6-OHDA verstärkt wird, v.a. durch eine kontinuierliche Applikation stärkerer UPS-Hemmung [Fornai, et al. 2005]. An dieser Stelle jedoch gibt es eine Gemeinsamkeit in den Mechanismen der Toxizität beider Toxine - so unterschiedlich sie auch in ihrem Wirkmechanismus sein mögen.

Kritisch anzumerken bleibt, dass das Model von Fornai et al. bisher nicht repliziert wurde [Fornai, et al. 2005]. Letztlich bleibt an dieser Stelle auch offen, ob das UPS in der Tat für die verminderte Vulnerabilität gegenüber MPTP und 6-OHDA verantwortlich ist. Ein entsprechender Versuch müsste die UPS Inhibition im Vergleich zwischen beiden Stämmen und in Abhängigkeit einer MPTP- und 6-OHDA-Läsion zeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination verschiedener Parkinsonmodelle und deren Erkenntnisse einen guten Ansatz zur Aufklärung möglicher schädigender Eigenschaften von α -Syn bietet. Die Aufklärung dieses Mechanismus könnte maßgeblich zum Verständnis der Pathogenese des M. Parkinson beitragen und neue Therapiemöglichkeiten aufzeigen.

5. Zusammenfassung

Der Morbus Parkinson ist eine der häufigsten chronischen neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen. Ihr zu Grunde liegt in erster Linie die Degeneration dopaminerges Neurone in der Substantia nigra. Intrazelluläre zytoplasmatische, proteinhaltige Einschlusskörperchen (Lewy-Körperchen) finden sich in Gehirnen erkrankter Menschen. Diese Einschlusskörperchen enthalten u.a. zu einem hohen Anteil das Protein alpha-Synuclein (α -Syn). Mit der Entdeckung von Mutationen im Syn-Gen, die in Frühformen des M. Parkinson auftraten, rückte α -Syn in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Bis heute ist die Rolle des α -Syn beim M. Parkinson noch nicht geklärt. Es wurde jedoch vorgeschlagen, dass α -Syn dopaminerge Neurone gegenüber oxidativen Stress sensibilisiert sowie die Bildung freier Radikale erhöht, insgesamt also einen schädigenden Einfluss auf dopaminergen Neurone hat.

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von zwei Tiermodellen des M. Parkinson, dem subchronischen-MPTP und dem 6-OHDA-Modell, dieser schädigende Einfluss untersucht und durch die Kombination beider Modelle mögliche Hinweise auf Mechanismen der Schädigung gefunden werden. Es wurden dafür α -Syn Wildtyp und α -Syn knock-out Mäuse mit beiden Toxinen behandelt.

Es konnte gezeigt werden, dass

- eine Deletion von α -Syn gegen eine Intoxikation mit MPTP schützt
- dieser Schutz auch in einem weiteren Modell, dem 6-OHDA-Modell, partiell besteht
- sich der Schutz im MPTP Modell nicht auf eine veränderte Pharmakokinetik des MPTP selbst zurückführen lässt
- der Schutz durch eine α -Syn Deletion gegen MPTP nicht auf eine verringerte Radikalbildung zurückzuführen ist.

Daraus ergaben sich verschiedene Schlussfolgerungen.

Es ist möglich, dass die Radikale erhöhenden Eigenschaften von α -Syn abhängig vom Parkinsonmodell und dem applizierten Neurotoxin sein könnten.

Da MPTP weit weniger Hydroxylradikale erzeugt als 6-OHDA, könnte es sein, dass die Effekte von α -Syn auf freie Radikale möglicherweise direkt mit dem Ausmaß des

induzierten oxidativen Stress zusammenhängen. Auch sind die Effekte von 6-OHDA und MPTP auf die α -Syn Expression gegensätzlich. Während MPTP die α -Syn mRNA bzw. den Proteinspiegel erhöht, senkt 6-OHDA die α -Syn mRNA Expression. Schließlich fördert 6-OHDA, jedoch nicht MPTP/MPP⁺ die Aggregation von α -Syn in-vitro. Die Aggregation von α -Syn wiederum kann zu einer verstärkten Radikalbildung in der Mikroglia führen. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, müssten weitere Versuche mit anderen Parkinsonmodellen durchgeführt und in allen Modellen die Höhe der gebildeten Radikale bestimmt werden.

Möglicherweise führt die Abwesenheit von α -Syn zu einer verminderten Hemmung des UPS durch MPTP und 6-OHDA und vermindert somit deren Toxizität.

Dieses scheint ebenso plausibel und beide Ansätze schließen sich nicht aus. Eine Kompromittierung des UPS könnte in der Tat in beiden Modellen eine Rolle spielen, da sie durch beide Toxine hervorgerufen wird und gezeigt werden konnte, dass das UPS eine entscheidende Rolle in der verminderten Vulnerabilität der α -Syn KO Mäuse spielt. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, müssten ebenfalls weitere Versuche zeigen, ob die UPS Inhibition zwischen beiden Stämmen in Abhängigkeit einer 6-OHDA und einer MPTP Behandlung unterschiedlich ist.

Auch wenn die Arbeit letztlich den Mechanismus der schädigenden Wirkung von α -Syn nicht restlos aufklären konnte, lässt sie einige Hinweise auf die Rolle von α -Syn in diesen beiden Modellen zu und konnte die Hypothese, dass α -Syn ein „Radikal-enhancer“ per se ist, widerlegen. In der Arbeit konnten weitere mögliche Mechanismen der schädigenden Eigenschaften von α -Syn aufgezeigt werden. Die Aufklärung dieses Mechanismus wäre ein entscheidender Schritt zum vertieften Verständnis der Pathogenese des M. Parkinson und würde so auch Rückschlüsse auf Therapiemöglichkeiten eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W. H. Ho, P. E. Castillo, N. Shinsky, J. M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, A. Rosenthal, 2000, Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system: *Neuron*, v. 25, p. 239-252.

Adams, J. D., Jr., L. K. Klaidman, P. Ribeiro, 1997, Tyrosine hydroxylase: mechanisms of oxygen radical formation: *Redox. Rep.*, v. 3, p. 273-279.

Ahn, B. H., H. Rhim, S. Y. Kim, Y. M. Sung, M. Y. Lee, J. Y. Choi, B. Wolozin, J. S. Chang, Y. H. Lee, T. K. Kwon, K. C. Chung, S. H. Yoon, S. J. Hahn, M. S. Kim, Y. H. Jo, d. S. Min, 2002, alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells: *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 12334-12342.

Albin, R. L., A. B. Young, J. B. Penney, 1995, The functional anatomy of disorders of the basal ganglia: *Trends Neurosci.*, v. 18, p. 63-64.

Ali, S. F., S. N. David, G. D. Newport, 1993, Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice: *Neurotoxicology*, v. 14, p. 29-34.

Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, Oertel WH, Hartmann A., 2008, Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice: *Exp Neurol.*, v. 210, p. 182-93

Alves da Costa, C., E. Paitel, B. Vincent, F. Checler, 2002, Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J Biol Chem.*, v. 277, p. 50980-50984.

Alves da Costa,C, J Dunys, F Brau, S Wilk, R Cappai, F Checler, 2006, 6-Hydroxydopamine but not 1-methyl-4-phenylpyridinium abolishes alpha-synuclein anti-apoptotic phenotype by inhibiting its proteasomal degradation and by promoting its aggregation: J Biol Chem., v. 281, p. 9824-9831.

Beal,MF, 2001, Experimental models of Parkinson's disease: Nat.Rev.Neurosci., v. 2, p. 325-334.

Beal,MF, 2003, Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 991, p. 120-131.

Beckman,JS, T W Beckman, J Chen, P A Marshall, B A Freeman, 1990, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 87, p. 1620-1624.

Ben Shachar,D., Eshel, G., Finberg, J. P., and Youdim, M. B., 1991, The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine- induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. J.Neurochem., v. 56, p. 1441-1444.

Berger,K., Przedborski, S., und Cadet, J. L., 1991, Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. Brain Res.Bull., v.26, p. 301-307.

Berretta,N et al., 2005, Acute effects of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons of the rat substantia nigra pars compacta in vitro. Neurotoxicology; v. 26, p. 869-81.

Bezard,E, C E Gross, M C Fournier, S Dovero, B Bloch, M Jaber, 1999, Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter: Exp.Neurol., v. 155, p. 268-273.

Blanchard,V, R Raisman-Vozari, S Vyas, P P Michel, F Javoy-Agid, G Uhl, Y Agid, 1994, Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon: Brain Res.Mol.Brain Res., v. 22, p. 29-38.

Bove,J, D Prou, C Perier, S Przedborski, 2005, Toxin-induced models of Parkinson's disease: *NeuroRx.*, v. 2, p. 484-494.

Boyce,S, Kelly E, Reavill C, Jenner P and Marsden CD.Repeated administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurons. *Biochem.Pharmacol.*1984, v. 33, p. 1747-1752.

Buchman,VL, H J Hunter, L G Pinon, J Thompson, E M Privalova, N N Ninkina, A M Davies, 1998, Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system: *J.Neurosci.*, v. 18, p. 9335-9341.

Cabin,DE, K Shimazu, D Murphy, N B Cole, W Gottschalk, K L McIlwain, B Orrison, A Chen, C E Ellis, R Paylor, B Lu, R L Nussbaum, 2002, Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein: *J.Neurosci.*, v. 22, p. 8797-8807.

Chen,RC, S F Chang, C L Su, T H Chen, M F Yen, H M Wu, Z Y Chen, H H Liou, 2001, Prevalence, incidence, and mortality of PD: a door-to-door survey in Ilan county, Taiwan: *Neurology*, v. 57, p. 1679-1686.

Chen,X, H A de Silva, M J Pettenati, P N Rao, P George-Hyslop, A D Roses, Y Xia, K Horsburgh, K Ueda, T Saitoh, 1995, The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis: *Genomics*, v. 26, p. 425-427.

Chiba-Falek,O, J A Kowalak, M E Smulson, R L Nussbaum, 2005, Regulation of alpha-synuclein expression by poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) binding to the NACP-Rep1 polymorphic site upstream of the SNCA gene: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 76, p. 478-492.

Chiba,K, A Trevor, N Castagnoli, Jr., 1984, Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 120, p. 574-578.

Choi,HS, JJ An, SY Kim, SH Lee, DW Kim, KY Yoo, MH Won, TC Kang, HJ Kwon, JH Kang, SW Cho, OS Kwon, J Park, WS Eum, SY Choi, 2006, PEP-1-SOD fusion protein efficiently protects against paraquat-induced dopaminergic neuron damage in a Parkinson disease mouse model: *Free Radic Biol.Med.*, v. 41, p. 1058-1068.

Clayton,DF, J M George, 1998, The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease: *Trends Neurosci.*, v. 21, p. 249-254.

Cohen,G, R E Heikkila, 1974, The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents: *J.Biol.Chem.*, v. 249, p. 2447-2452.

Cohen,G, 1984, Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons: *Neurotoxicology*, v. 5, p. 77-82.

Conway,KA, J D Harper, P T Lansbury, 1998, Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease: *Nat.Med.*, v. 4, p. 1318-1320.

Conway,KA, S J Lee, J C Rochet, T T Ding, R E Williamson, P T Lansbury, Jr., 2000, Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 97, p. 571-576.

Conway,KA, J C Rochet, R M Bieganski, P T Lansbury, Jr., 2001, Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct: *Science*, v. 294, p. 1346-1349.

Cookson, MR., 2006, Hero versus antihero: the multiple roles of alpha-synuclein in neurodegeneration: *Exp Neurol*. v. 199, p. 238-242.

Corti,O, C Hampe, F Darios, P Ibanez, M Ruberg, A Brice, 2005, Parkinson's disease: from causes to mechanisms: C.R.Biol., v. 328, p. 131-142.

Cosi,C, F Colpaert, W Koek, A Degryse, M Marien, 1996, Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect against MPTP-induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57B1/6 mice: Brain Res., v. 729, p. 264-269.

Damier,P, E C Hirsch, Y Agid, A M Graybiel, 1999, The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry: Brain, v. 122 (Pt 8), p. 1421-1436.

Daniels,GM, S G Amara, 1999, Regulated trafficking of the human dopamine transporter. Clathrin-mediated internalization and lysosomal degradation in response to phorbol esters: J.Biol.Chem., v. 274, p. 35794-35801.

Dauer,W, N Kholodilov, M Vila, A C Trillat, R Goodchild, K E Larsen, R Staal, K Tieu, Y Schmitz, C A Yuan, M Rocha, V Jackson-Lewis, S Hersch, D Sulzer, S Przedborski, R Burke, R Hen, 2002, Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 99, p. 14524-14529.

Davies,K. J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie v.83, p. 301–310.

Davidson,WS, A Jonas, D F Clayton, J M George, 1998, Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes: J.Biol.Chem., v. 273, p. 9443-9449.

de Lau,LM, P C Giesbergen, M C de Rijk, A Hofman, P J Koudstaal, M M Breteler, 2004, Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study: Neurology, v. 63, p. 1240-1244.

Denicola,A, R Radi, 2005, Peroxynitrite and drug-dependent toxicity: Toxicology, v. 208, p. 273-288.

Desai,VG, R J Feuers, R W Hart, S F Ali, 1996, MPP(+)-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport: Brain Res., v. 715, p. 1-8.

Di Monte,DA, 1991, Mitochondrial DNA and Parkinson's disease: Neurology, v. 41, p. 38-42.

Ding,Q, K Reinacker, E Dimayuga, V Nukala, J Drake, D A Butterfield, J C Dunn, S Martin, A J Bruce-Keller, J N Keller, 2003, Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress: FEBS Lett., v. 546, p. 228-232.

Ding,YM, Jaumotte JD, Signore AP, Zigmond MJ, 2004, Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor: J Neurochem; v. 89: 776-787

Dluzen,DE, J L McDermott, 2000, Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease: J.Gend.Specif.Med., v. 3, p. 36-42.

Drolet,RE, B Behrouz, K J Lookingland, J L Goudreau, 2004, Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration: Neurotoxicology, v. 25, p. 761-769.

Du,HN, L Tang, X Y Luo, H T Li, J Hu, J W Zhou, H Y Hu, 2003, A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein: Biochemistry, v. 42, p. 8870-8878.

Duda,JE, U Shah, S E Arnold, V M Lee, J Q Trojanowski, 1999, The expression of alpha-, beta-, and gamma-synucleins in olfactory mucosa from patients with and without neurodegenerative diseases: Exp.Neurol., v. 160, p. 515-522.

Duka,T, M Rusnak, RE Drolet, V Duka, C Wersinger, JL Goudreau, A Sidhu, 2006, Alpha-synuclein induces hyperphosphorylation of Tau in the MPTP model of parkinsonism: FASEB J., v. 20, p. 2302-2312.

El Agnaf,OM, G B Irvine, 2002, Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides: Biochem.Soc.Trans., v. 30, p. 559-565.

Elkon,H, E Melamed, D Offen, 2001, 6-Hydroxydopamine increases ubiquitin-conjugates and protein degradation: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease: Cell Mol Neurobiol., v. 21, p. 771-781.

Ellis,CE, P L Schwartzberg, T L Grider, D W Fink, R L Nussbaum, 2001, alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases: J.Biol.Chem., v. 276, p. 3879-3884.

Feany,MB, W W Bender, 2000, A Drosophila model of Parkinson's disease: Nature, v. 404, p. 394-398.

Feng,Z, D Li, P C Fung, Z Pei, D B Ramsden, S L Ho, 2003, COX-2-deficient mice are less prone to MPTP-neurotoxicity than wild-type mice: Neuroreport, v. 14, p. 1927-1929.

Ferger,B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K and Oertel WH. Salicylate protects against MPTP-induced impairments in dopaminergic neurotransmission at the striatal and nigral level in mice. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol1999, v.360, p. 256-261.

Ferger,B, C Themann, S Rose, B Halliwell, P Jenner, 2001, 6-hydroxydopamine increases the hydroxylation and nitration of phenylalanine in vivo: implication of peroxynitrite formation: J.Neurochem., v. 78, p. 509-514.

Ferger,B, Rose S, Jenner A, Halliwell B, Jenner P, 2001, 6-hydroxydopamine increases hydroxyl free radical production and DNA damage in rat striatum. Neuroreport, v. 12: 1155-1159.

Fonck,C, M Baudry, 2003, Rapid reduction of ATP synthesis and lack of free radical formation by MPP+ in rat brain synaptosomes and mitochondria: Brain Res., v. 975, p. 214-221.

Fornai,F, O M Schluter, P Lenzi, M Gesi, R Ruffoli, M Ferrucci, G Lazzeri, C L Busceti, F Pontarelli, G Battaglia, A Pellegrini, F Nicoletti, S Ruggieri, A Paparelli, T C Sudhof, 2005, Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 102, p. 3413-3418.

Franklin BJ, Paxinos GT, Gahwiler BH, Capogna M, Debanne, 1996, The mouse brain in stereotaxic coordinates. NewYork: Academic Press.

Freyberg,Z, S Bourgoïn, D Shields, 2002, Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells: Mol.Biol.Cell, v. 13, p. 3930-3942.

Gainetdinov,RR, F Fumagalli, S R Jones, M G Caron, 1997, Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter: J.Neurochem., v. 69, p. 1322-1325.

Gainetdinov,RR, F Fumagalli, Y M Wang, S R Jones, A I Levey, G W Miller, M G Caron, 1998, Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice: J.Neurochem., v. 70, p. 1973-1978.

Galvin,JE, K Uryu, V M Lee, J Q Trojanowski, 1999, Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 96, p. 13450-13455.

Gao,HM, B Liu, W Zhang, J S Hong, 2003, Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease: FASEB J., v. 17, p. 1954-1956.

George,JM, 2002, The synucleins: Genome Biol., v. 3, p. REVIEWS3002.

George, JM, H Jin, W S Woods, D F Clayton, 1995, Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch: *Neuron*, v. 15, p. 361-372.

Giasson, BI, V M Lee, 2003, Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease?: *Cell*, v. 114, p. 1-8.

Gibb, WR, A J Lees, 1989, The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, v. 15, p. 27-44.

Giovanni, A, P K Sonsalla, R E Heikkila, 1994, Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, p. 1008-1014.

Glinka, Y, M Gassen, M B Youdim, 1997, Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: *J. Neural. Transm. Suppl.*, v. 50, p. 55-66.

Glickman, MH, A Ciechanover, 2002, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction: *Physiol. Rev.*, v. 82, p. 373-428.

Goedert, M, 2001, Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies: *Clin. Chem. Lab Med.*, v. 39, p. 308-312.

Goedert, M, M G Spillantini, S W Davies, 1998, Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 8, p. 619-632.

Gonzales, RA, M O Job, W M Doyon, 2004, The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement: *Pharmacol. Ther.*, v. 103, p. 121-146.

Gorell, JM, EL Peterson, BA Rybicki, CC Johnson, 2006, Multiple risk factors for Parkinson's disease, *J. Neurol. Sci.*, v. 217, p. 169-174.

Graham,DG, 1978, Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones: Mol.Pharmacol., v. 14, p. 633-643.

Hald,A, J Lotharius, 2005, Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?: Exp.Neurol., v. 193, p. 279-290.

Halliwell,B, 1991, Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease: Am.J.Med., v. 91, p. 14S-22S.

Halvorsen,Ø, OB Tysnes, 2007, Dementia in Parkinson's disease, Tidsskr Nor Laegeforen: v. 127, p. 2517-2520.

Hanrott,K, L Gudmunsen, M J O'Neill, S Wonnacott, 2006, 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta: J.Biol.Chem., v. 281, p. 5373-5382.

Hantraye,P, E Brouillet, R Ferrante, S Palfi, R Dolan, R T Matthews, M F Beal, 1996, Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons: Nat.Med., v. 2, p. 1017-1021.

Hartl,FU, M Hayer-Hartl, 2002, Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein: Science, v. 295, p. 1852-1858.

Hasegawa,E, K Takeshige, T Oishi, Y Murai, S Minakami, 1990, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 170, p. 1049-1055.

Hashimoto,M, L J Hsu, Y Xia, A Takeda, A Sisk, M Sundsmo, E Masliah, 1999, Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro: Neuroreport, v. 10, p. 717-721.

Hashimoto,M, L J Hsu, E Rockenstein, T Takenouchi, M Mallory, E Masliah, 2002, alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-

terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells: *J.Biol.Chem.*, v. 277, p. 11465-11472.

He,Y, Thong, P. S., Lee, T., Leong, S. K., Shi, C. Y., Wong, P. T., Yuan, S. Y., und Watt, F., 1996, Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study. *Brain Res.*, v.735, p. 149-153.

Heikkila,R, G Cohen, 1971, Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine: *Science*, v. 172, p. 1257-1258.

Heikkila,RE, L Manzino, F S Cabbat, R C Duvoisin, 1984a, Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors: *Nature*, v. 311, p. 467-469.

Heikkila,RE, Cabbat FS, Manzino L, Duvoisin RC, 1984b, Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology*; v. 23, p. 711-713.

Heikkila,RE, B A Sieber, L Manzino, P K Sonsalla, 1989, Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: *Mol.Chem.Neuropathol.*, v. 10, p. 171-183.

Hellenbrand,W, P Vieregge, B P Robra, P Nischan, J Glass, P Haagen, J Jorg, W H Oertel, E Schneider, G Ulm, 1993, [Etiology of Parkinson disease. An epidemiologic perspective with possible implications for prevention]: *Nervenarzt*, v. 64, p. 770-786.

Henze,C, C Earl, J Sautter, N Schmidt, C Themann, A Hartmann, WH Oertel, 2005, Reactive oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesion in rats: *Brain Res.*, v. 1052, p. 97-104.

Heuser,JE, T S Reese, 1973, Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction: *J.Cell Biol.*, v. 57, p. 315-344.

Hirsch,EC, S Hunot, A Hartmann, 2005, Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease: Parkinsonism.Relat.Disord., v. 11 Suppl 1, p. S9-S15.

Hirsch,E, AM Graybiel, YA Agid, 1988,Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease, Nature, v. 334, p. 345-348.

Hsu,LJ, M Mallory, Y Xia, I Veinbergs, M Hashimoto, M Yoshimoto, L J Thal, T Saitoh, E Masliah, 1998, Expression pattern of synucleins (non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/alpha-synuclein) during murine brain development: J.Neurochem., v. 71, p. 338-344.

Hsu,LJ, Y Sagara, A Arroyo, E Rockenstein, A Sisk, M Mallory, J Wong, T Takenouchi, M Hashimoto, E Masliah, 2000, alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress: Am.J.Pathol., v. 157, p. 401-410.

Hung,HC, E H Lee, 1998, MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: Free Radic.Biol.Med., v. 24, p. 76-84.

Ischiropoulos,H, JS Beckman, 2003, Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?: J.Clin.Invest., v. 111, p. 163-169.

Iwai,A, E Masliah, M Yoshimoto, N Ge, L Flanagan, H A de Silva, A Kittel, T Saitoh, 1995, The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system: Neuron, v. 14, p. 467-475.

Iwata,A, M Maruyama, I Kanazawa, N Nukina, 2001a, alpha-Synuclein affects the MAPK pathway and accelerates cell death: J.Biol.Chem., v. 276, p. 45320-45329.

Iwata,A, S Miura, I Kanazawa, M Sawada, N Nukina, 2001b, alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1: J.Neurochem., v. 77, p. 239-252.

Iwata,SI, Nomoto M, Fukuda T, 2001, Regulation of GAP-43 protein and mRNA in nigrostriatal dopaminergic neurons after the partial destruction of dopaminergic

terminals with intrastriatal 6-hydroxydopamine. *Synapse*, v. 39, p. 16-22.

Iwata,S, M Nomoto, H Morioka, A Miyata, 2004, Gene expression profiling in the midbrain of striatal 6-hydroxydopamine-injected mice: *Synapse*, v. 51, p. 279-286.

Jackson-Lewis,V, M Jakowec, R E Burke, S Przedborski, 1995, Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: *Neurodegeneration.*, v. 4, p. 257-269.

Jakes,R, M G Spillantini, M Goedert, 1994, Identification of two distinct synucleins from human brain: *FEBS Lett.*, v. 345, p. 27-32.

Javitch,JA, R J D'Amato, S M Strittmatter, S H Snyder, 1985, Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 82, p. 2173-2177.

Jenco,JM, A Rawlingson, B Daniels, A J Morris, 1998, Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins: *Biochemistry*, v. 37, p. 4901-4909.

Jenner,P, 1991, Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease: *Acta Neurol.Scand.Suppl.*, v. 136, p. 6-15.

Jenner,P, C W Olanow, 1998, Understanding cell death in Parkinson's disease: *Ann.Neurol.*, v. 44, p. S72-S84.

Jensen,PJ, B J Alter, K L O'Malley, 2003, Alpha-synuclein protects naive but not dbcAMP-treated dopaminergic cell types from 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity: *J.Neurochem.*, v. 86, p. 196-209.

Jeon,BS, V Jackson-Lewis, R E Burke, 1995, 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death: *Neurodegeneration.*, v. 4, p. 131-137.

Ji,H, Y E Liu, T Jia, M Wang, J Liu, G Xiao, B K Joseph, C Rosen, Y E Shi, 1997, Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing: *Cancer Res.*, v. 57, p. 759-764.

Jones,BE, C B Boylan, M Fritsche, M Juhasz, C Jackson, S J Wiegand, C Hyman, R M Lindsay, C A Altar, 1996, A continuous striatal infusion of 6-hydroxydopamine produces a terminal axotomy and delayed behavioral effects: *Brain Res.*, v. 709, p. 275-284.

Junn,E, M M Mouradian, 2002, Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine: *Neurosci.Lett.*, v. 320, p. 146-150.

Kahle,PJ, M Neumann, L Ozmen, C Haass, 2000, Physiology and pathophysiology of alpha-synuclein. Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 920, p. 33-41.

Kakimura,J, Y Kitamura, K Takata, Y Kohno, Y Nomura, T Taniguchi, 2001, Release and aggregation of cytochrome c and alpha-synuclein are inhibited by the antiparkinsonian drugs, talipexole and pramipexole: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 417, p. 59-67.

Kalaria,RN, Mitchell MJ and Harik SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc Natl.Acad.Sci.USA* 1987, v. 84, p. 3521-3525.

Karoum,F, S J Chrapusta, M F Egan, R J Wyatt, 1993, Absence of 6-hydroxydopamine in the rat brain after treatment with stimulants and other dopaminergic agents: a mass fragmentographic study: *J.Neurochem.*, v. 61, p. 1369-1375.

Keller, J. N., Huang, F. F., Dimayuga, E. R., and Maragos, W. F., 2000, Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line: *Free Radical Biol. Med.*, v. 29, p.1037–1042.

Kholodilov, NG, TF Oo, RE Burke, 1999, Synuclein expression is decreased in rat substantia nigra following induction of apoptosis by intrastriatal 6-hydroxydopamine: *Neurosci Lett.*, v. 275, p. 105-108.

Kim, KS, SY Choi, HY Kwon, MH Won, TC Kang, JH Kang, 2002, The ceruloplasmin and hydrogen peroxide system induces alpha-synuclein aggregation in vitro: *Biochimie.*, v. 84, p. 625-631.

Kiss, L, C Szabo, 2005, The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 100 Suppl 1, p. 29-37.

Klivenyi, P, D Siwek, G Gardian, L Yang, A Starkov, C Cleren, R J Ferrante, N W Kowall, A Abeliovich, M F Beal, 2005, Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins: *Neurobiol.Dis.*, v. 21, p. 541-8.

Koolmann J., Röhm K.-H., Taschenatlas der Biochemie, Thieme Verlag, 2. erweiterte Auflage, 1997

Kopin, IJ, J H White, K Bankiewicz, 1988, A new approach to biochemical evaluation of brain dopamine metabolism: *Cell Mol.Neurobiol.*, v. 8, p. 171-179.

Kowall, NW, P Hantraye, E Brouillet, M F Beal, A C McKee, R J Ferrante, 2000, MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons: *Neuroreport*, v. 11, p. 211-213.

Kruger, R, W Kuhn, T Muller, D Woitalla, M Graeber, S Kosel, H Przuntek, J T Epplen, L Schols, O Riess, 1998, Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease: *Nat.Genet.*, v. 18, p. 106-108.

Kühn,K, J Wellen, N Link, L Maskri, H Lübbert, CC Stichel, 2003, The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons: *Eur J Neurosci.*, v. 17, p. 1-12.

Kumar,R, A K Agarwal, P K Seth, 1995, Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine: *J.Neurochem.*, v. 64, p. 1703-1707.

Kuopio,AM, R J Marttila, H Helenius, U K Rinne, 1999, Environmental risk factors in Parkinson's disease: *Mov.Disord.*, v. 14, p. 928-939.

Kurosaki,R, Y Muramatsu, H Kato, T Araki, 2004, Biochemical, behavioral and immunohistochemical alterations in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease: *Pharmacol.Biochem.Behav.*, v. 78, p. 143-153.

Kurkowska-Jastrzebska,I, A Wronska, M Kohutnicka, A Czlonkowski, A Czlonkowska, 1999, The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse: *Exp.Neurol.*, v. 156, p. 50-61.

Kurosaki R, Y Muramatsu, H Kato, T Araki, 2004, Biochemical, behavioral and immunohistochemical alterations in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease: *Pharmacol.Biochem.Behav.*, v. 78: p. 143-153.

Lang,AE, A M Lozano, 1998, Parkinson's disease. First of two parts: *N.Engl.J.Med.*, v. 339, p. 1044-1053.

Langston,JW, P A Ballard, Jr., 1983, Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine: *N.Engl.J.Med.*, v. 309, p. 310.

Langston,JW, Irwin I, Langston EB and Forno LS. 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci.Lett* 1984, v. 48, p. 87-92.

Langston,JW, I Irwin, 1986, MPTP: current concepts and controversies: *Clin.Neuropharmacol.*, v. 9, p. 485-507.

Langston,JW, 1987a, MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease: Eur.Neurol., v. 26 Suppl 1, p. 2-10.

Langston,JW, 1987b, Parkinson's disease: current view: Am.Fam.Physician, v. 35, p. 201-206.

Lansbury,PT, Jr., 1999, Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 96, p. 3342-3344.

Lansbury,PT, HA Lashuel, 2006, A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic: Nature., v. 443, p. 774-779.

Lavedan,C, 1998, The synuclein family: Genome Res., v. 8, p. 871-880.

Lavedan,C, E Leroy, A Dehejia, S Buchholtz, A Dutra, R L Nussbaum, M H Polymeropoulos, 1998, Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene: Hum.Genet., v. 103, p. 106-112.

Lee,D, S Y Lee, E N Lee, C S Chang, S R Paik, 2002, alpha-Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes: J.Neurochem., v. 82, p. 1007-1017.

Lee,FJ, F Liu, Z B Pristupa, H B Niznik, 2001, Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis: FASEB J., v. 15, p. 916-926.

Lee,HJ, S J Lee, 2002, Characterization of cytoplasmic alpha-synuclein aggregates. Fibril formation is tightly linked to the inclusion-forming process in cells: J.Biol.Chem., v. 277, p. 48976-48983.

Lehmensiek,V, E M Tan, S Liebau, T Lenk, H Zettlmeisl, J Schwarz, A Storch, 2006, Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of 6-hydroxydopamine in vitro depends on expression of mutant alpha-synucleins related to Parkinson's disease: Neurochem.Int., v. 48, p. 329-340

Lehmentsiek,V, E M Tan, J Schwarz, A Storch, 2002, Expression of mutant alpha-synucleins enhances dopamine transporter-mediated MPP+ toxicity in vitro: *Neuroreport*, v. 13, p. 1279-1283.

Liscovitch,M, M Czarny, G Fiucci, X Tang, 2000, Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family: *Biochem.J.*, v. 345 Pt 3, p. 401-415.

Liu,Y, D Peter, A Roghani, S Schuldiner, G G Prive, D Eisenberg, N Brecha, R H Edwards, 1992, A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter: *Cell*, v. 70, p. 539-551.

Lotharius,J, Dugan,LL, O'Malley,KL, 1999, Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons: *J.Neurosci.*, v. 19, p.1284-1293

Lotharius,J, S Barg, P Wiekop, C Lundberg, H K Raymon, P Brundin, 2002, Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line: *J.Biol.Chem.*, v. 277, p. 38884-38894.

Lotharius,J, P Brundin, 2002, Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease: *Hum.Mol.Genet.*, v. 11, p. 2395-2407.

Lucking,CB, A Brice, 2000, Alpha-synuclein and Parkinson's disease: *Cell Mol.Life Sci.*, v. 57, p. 1894-1908.

Lundblad,M, Picconi B, Lindgren H, Cenci MA, 2004, A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function: *Neurobiol.Dis.*, v. 16, p. 110-123.

Luthman,J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T, 1989, Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav.Brain.Res.*, v. 33: p. 267-277.

Maker,HS, C Weiss, D J Silides, G Cohen, 1981, Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates: J.Neurochem., v. 36, p. 589-593.

Manning-Bog,AB, A L McCormack, M G Purisai, L M Bolin, D A Di Monte, 2003, Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration: J.Neurosci., v. 23, p. 3095-3099.

Markey,SP, J N Johannessen, C C Chiueh, R S Burns, M A Herkenham, 1984, Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism: Nature, v. 311, p. 464-467.

Maroteaux,L, J T Campanelli, R H Scheller, 1988, Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal: J.Neurosci., v. 8, p. 2804-2815.

Martinez,J, I Moeller, H Erdjument-Bromage, P Tempst, B Luring, 2003, Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is a calmodulin substrate: J.Biol.Chem., v. 278, p. 17379-17387.

Masliah,E, E Rockenstein, I Veinbergs, M Mallory, M Hashimoto, A Takeda, Y Sagara, A Sisk, L Mucke, 2000, Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders: Science, v. 287, p. 1265-1269.

McNaught,KS, R Belizaire, O Isacson, P Jenner, C W Olanow, 2003, Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease: Exp.Neurol., v. 179, p. 38-46.

McNaught K.S., Perl D.P., Brownell A.L. and Olanow C.W. (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. Ann. Neurol. 56, 149-162.

Meredith,GE, S Totterdell, E Petroske, K Santa Cruz, RC Callison Jr, YS Lau., 2002, Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease: *Brain Res.*, v. 22;956, p. 156-165.

Mezey,E, A M Dehejia, G Harta, N Tresser, S F Suchy, R L Nussbaum, M J Brownstein, M H Polymeropoulos, 1998, Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease: *Mol.Psychiatry*, v. 3, p. 493-499.

Michel,PP, F Hefti, 1990, Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture: *J.Neurosci.Res.*, v. 26, p. 428-435.

Miller,DB, S F Ali, J P O'Callaghan, S C Laws, 1998, The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 844, p. 153-165.

Mimura, M., 2007, Depression and apathy in Parkinson disease: *Brain Nerve*, v. 59, p. 935-942.

Mohanakumar KP, Muralikrishnan D and Thomas B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 2000, v. 864, p. 281-290.

Moore,DJ, A B West, V L Dawson, T M Dawson, 2005, Molecular pathophysiology of Parkinson's disease: *Annu.Rev.Neurosci.*, v. 28, p. 57-87.

Moron,JA, I Zakharova, J V Ferrer, G A Merrill, B Hope, E M Lafer, Z C Lin, J B Wang, J A Javitch, A Galli, T S Shippenberg, 2003, Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity: *J.Neurosci.*, v. 23, p. 8480-8488.

Morris,HR, 2005, Genetics of Parkinson's disease: *Ann.Med.*, v. 37, p. 86-96.

Murphy,DD, S M Rueter, J Q Trojanowski, V M Lee, 2000, Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons: *J.Neurosci.*, v. 20, p. 3214-3220.

Mytilineou,C, G Cohen, 1984, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine destroys dopamine neurons in explants of rat embryo mesencephalon: Science, v. 225, p. 529-531.

Nakajo,S, S Shioda, Y Nakai, K Nakaya, 1994, Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization: Brain Res.Mol.Brain Res., v. 27, p. 81-86.

Nakamura,T, H Yamashita, Y Nagano, T Takahashi, S Avraham, H Avraham, M Matsumoto, S Nakamura, 2002, Activation of Pyk2/RAFTK induces tyrosine phosphorylation of alpha-synuclein via Src-family kinases: FEBS Lett., v. 521, p. 190-194.

Narhi,L, S J Wood, S Steavenson, Y Jiang, G M Wu, D Anafi, S A Kaufman, F Martin, K Sitney, P Denis, J C Louis, J Wypych, A L Biere, M Citron, 1999, Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation: J.Biol.Chem., v. 274, p. 9843-9846.

Nicklas,WJ, I Vyas, R E Heikkila, 1985, Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine: Life Sci., v. 36, p. 2503-2508.

Nieto,M, F J Gil-Bea, E Dalfo, M Cuadrado, F Cabodevilla, B Sanchez, S Catena, T Sesma, E Ribe, I Ferrer, M J Ramirez, T Gomez-Isla, 2005, Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P transgenic mice: Neurobiol.Aging, v.27, p. 848-856

Ninkina,NN, M V Alimova-Kost, J W Paterson, L Delaney, B B Cohen, S Imreh, N V Gnuchev, A M Davies, V L Buchman, 1998, Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene: Hum.Mol.Genet., v. 7, p. 1417-1424.

Nirenberg,MJ, R A Vaughan, G R Uhl, M J Kuhar, V M Pickel, 1996, The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons: J.Neurosci., v. 16, p. 436-447.

Oades,RD, G M Halliday, 1987, Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity: Brain Res., v. 434, p. 117-165.

Obata,T, 2002, Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation: J.Neural Transm., v. 109, p. 1159-1180.

Oberdisse E., Hackenthal E., Kuschinsky K., Pharmakologie und Toxikologie, Springer Verlag, 3. Auflage, 2002

Oertel,WH, 1995, Parkinson's disease: epidemiology, (differential) diagnosis, therapy, relation to dementia: Arzneimittelforschung., v. 45, p. 386-389.

Ogawa,N, 1994, [Treatment of Parkinson disease with L-DOPA and dopamine agonists]: Nippon Naika Gakkai Zasshi, v. 83, p. 575-580.

Okochi,M, J Walter, A Koyama, S Nakajo, M Baba, T Iwatsubo, L Meijer, P J Kahle, C Haass, 2000, Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein: J.Biol.Chem., v. 275, p. 390-397.

Orth,M, SJ Tabrizi, C Tomlinson, K Messmer, LV Korlipara, AH Schapira, JM Cooper, 2004, G209A mutant alpha synuclein expression specifically enhances dopamine induced oxidative damage: Neurochem Int., v. 45, p. 669-676.

Ostrerova-Golts,N, L Petrucelli, J Hardy, J M Lee, M Farrer, B Wolozin, 2000, The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity: J.Neurosci., v. 20, p. 6048-6054.

Ostrerova,N, L Petrucelli, M Farrer, N Mehta, P Choi, J Hardy, B Wolozin, 1999, alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins: J.Neurosci., v. 19, p. 5782-5791.

Pamplona,LA, J P De Mattos, 1996, [Dementia in Parkinson's disease. Critical evaluation of the literature]: *Arq.Neuropsiquiatr.*, v. 54, p. 687-690.

Perez,RG, J C Waymire, E Lin, J J Liu, F Guo, M J Zigmond, 2002, A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis: *J.Neurosci.*, v. 22, p. 3090-3099.

Perrin,RJ, W S Woods, D F Clayton, J M George, 2001, Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 41958-41962.

Petersen,K, O F Olesen, J D Mikkelsen, 1999, Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex: *Neuroscience*, v. 91, p. 651-659.

Polymeropoulos,MH, C Lavedan, E Leroy, S E Ide, A Dehejia, A Dutra, B Pike, H Root, J Rubenstein, R Boyer, E S Stenroos, S Chandrasekharappa, A Athanassiadou, T Papapetropoulos, W G Johnson, A M Lazzarini, R C Duvoisin, G Di Iorio, L I Golbe, R L Nussbaum, 1997, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease: *Science*, v. 276, p. 2045-2047.

Pristupa,ZB, F McConkey, F Liu, H Y Man, F J Lee, Y T Wang, H B Niznik, 1998, Protein kinase-mediated bidirectional trafficking and functional regulation of the human dopamine transporter: *Synapse*, v. 30, p. 79-87.

Pronin,AN, A J Morris, A Surguchov, J L Benovic, 2000, Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 26515-26522.

Przedborski,S, Q Chen, M Vila, B I Giasson, R Djaldatti, S Vukosavic, J M Souza, V Jackson-Lewis, V M Lee, H Ischiropoulos, 2001, Oxidative post-translational modifications of alpha-synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease: *J.Neurochem.*, v. 76, p. 637-640.

Przedborski,S, V Jackson-Lewis, R Djaldetti, G Liberatore, M Vila, S Vukosavic, G Almer, 2000, The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism: Restor.Neurol.Neurosci., v. 16, p. 135-142.

Przedborski,S, V Jackson-Lewis, R Yokoyama, T Shibata, V L Dawson, T M Dawson, 1996, Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 93, p. 4565-4571.

Przedborski,S, V Kostic, V Jackson-Lewis, A B Naini, S Simonetti, S Fahn, E Carlson, C J Epstein, J L Cadet, 1992, Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity: J.Neurosci., v. 12, p. 1658-1667.

Purisai,MG, A L McCormack, W J Langston, L C Johnston, D A Di Monte, 2005, Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates: Neurobiol.Dis., v. 20, p. 898-906.

Quilty,MC, W P Gai, D L Pountney, A K West, J C Vickers, 2003, Localization of alpha-, beta-, and gamma-synuclein during neuronal development and alterations associated with the neuronal response to axonal trauma: Exp.Neurol., v. 182, p. 195-207.

Quilty,MC, A E King, W P Gai, D L Pountney, A K West, J C Vickers, T C Dickson, 2005, Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection: Exp.Neurol., v.199, p. 249-56.

Quilty,MC, AE King, WP Gai, DL Pountney, AK West, JC Vickers, TC Dickson, 2006, Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection: Exp.Neurol. v. 199, p. 249-256.

Ramsay,RR, A T Kowal, M K Johnson, J I Salach, T P Singer, 1987, The inhibition site of MPP+, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase: Arch.Biochem.Biophys., v. 259, p. 645-649.

Rathke-Hartlieb,S, P J Kahle, M Neumann, L Ozmen, S Haid, M Okochi, C Haass, J B Schulz, 2001, Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice: J.Neurochem., v. 77, p. 1181-1184.

Recchia,A, P Debetto, A Negro, D Guidolin, S D Skaper, P Giusti, 2004, Alpha-synuclein and Parkinson's disease: FASEB J., v. 18, p. 617-626.

Riachi,NJ, Behmand RA and Harik SI. Correlation of MPTP neurotoxicity in-vivo with oxidation of MPTP by the brain and blood-brain barrier in-vitro in five rat strains. Brain Res. 1991, v. 555, p. 19-24.

Richfield,EK, M J Thiruchelvam, D A Cory-Slechta, C Wuertzer, R R Gainetdinov, M G Caron, D A Di Monte, H J Federoff, 2002, Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice: Exp. Neurol., v. 175, p. 35-48.

Rideout,HJ, K E Larsen, D Sulzer, L Stefanis, 2001, Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells: J. Neurochem., v. 78, p. 899-908.

Rideout,H.J, Dietrich P., Wang Q., Dauer W.T. and Stefanis L. (2004) alpha-synuclein is required for the fibrillar nature of ubiquitinated inclusions induced by proteasomal inhibition in primary neurons. J. Biol. Chem., v. 279, p. 46915-46920

Robertson,DC, O Schmidt, N Ninkina, P A Jones, J Sharkey, V L Buchman, 2004, Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice: J. Neurochem., v. 89, p. 1126-1136.

Sachs,C, G Jonsson, 1975, Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine: *Biochem. Pharmacol.*, v. 24, p. 1-8.

Saner,A, H Thoenen, 1971, Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine: *Mol. Pharmacol.*, v. 7, p. 147-154.

Sanghera,MK, K F Manaye, C L Liang, A M Lacopino, M J Bannon, D C German, 1994, Low dopamine transporter mRNA levels in midbrain regions containing calbindin: *Neuroreport*, v. 5, p. 1641-1644.

Santiago,M, H Rollema, J B de Vries, B H Westerink, 1991a, Acute effects of intranigral application of MPP+ on nigral and bilateral striatal release of dopamine simultaneously recorded by microdialysis: *Brain Res.*, v. 538, p. 226-230.

Santiago,M, B H Westerink, H Rollema, 1991b, Responsiveness of striatal dopamine release in awake animals after chronic 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced lesions of the substantia nigra: *J. Neurochem.*, v. 56, p. 1336-1342.

Sauer,H, W H Oertel, 1994, Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat: *Neurosci.*, v. 59, p. 401-415.

Sauer,H, C Rosenblad, A Bjorklund, 1995, Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 92, p. 8935-8939.

Schikorski,T, C F Stevens, 1997, Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses: *J. Neurosci.*, v. 17, p. 5858-5867.

Schluter,OM, F Fornai, M G Alessandri, S Takamori, M Geppert, R Jahn, T C Sudhof, 2003, Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice: *Neurosci.*, v. 118, p. 985-1002.

Schmidt,A, M Wolde, C Thiele, W Fest, H Kratzin, A V Podtelejnikov, W Witke, W B Huttner, H D Soling, 1999, Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid: *Nat.*, v. 401, p. 133-141.

Schmidt,N, B Ferger., 2001, Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease: *J.Neural Transm.*, v. 108, p. 1263-1282.

Schulz,JB, M F Beal, 1995a, Neuroprotective effects of free radical scavengers and energy repletion in animal models of neurodegenerative disease: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 765, p. 100-110.

Schulz,JB, D R Henshaw, D Siwek, B G Jenkins, R J Ferrante, P B Cipolloni, N W Kowall, B R Rosen, M F Beal, 1995b, Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo: *J. Neurochem.*, v. 64, p. 2239-2247.

Shimada,S, S Kitayama, D Walther, G Uhl, 1992, Dopamine transporter mRNA: dense expression in ventral midbrain neurons: *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 13, p. 359-362.

Shimoji,M, L Zhang, A S Mandir, V L Dawson, T M Dawson, 2005, Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: *Brain Res.Mol.Brain Res.*, v. 134, p. 103-108.

Sidhu,A, C Wersinger, P Vernier, 2004, Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse?: *FASEB J.*, v. 18, p. 637-647.

Singer,TP, N Castagnoli, Jr., R R Ramsay, A J Trevor, 1987, Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: *J. Neurochem.*, v. 49, p. 1-8.

Singleton,AB, M Farrer, J Johnson, A Singleton, S Hague, J Kachergus, M Hulihan, T Peuralinna, A Dutra, R Nussbaum, S Lincoln, A Crawley, M Hanson, D Maraganore, C Adler, MR Cookson, M Muentner, M Baptista, D Miller, J Blancato, J Hardy, K Gwinn-Hardy, 2003, alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease: *Science*, v. 302, p. 841.

Sittler,A, Lurz R, Lueder G et al., 2001 Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease: Hum.Mol.Genet., v. 10, p. 1307-1315.

Sofic,E, P Riederer, H Heinsen, H Beckmann, G P Reynolds, G Hebenstreit, M B Youdim, 1988, Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain: J. Neural Transm., v. 74, p. 199-205.

Spillantini,MG, R A Crowther, R Jakes, M Hasegawa, M Goedert, 1998, alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A, v. 95, p. 6469-6473.

Spillantini,MG, A Divane, M Goedert, 1995, Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35: Genomics, v. 27, p. 379-381.

Spillantini,MG, M Goedert, 2000, The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 920, p. 16-27.

Spillantini,MG, M L Schmidt, V M Lee, J Q Trojanowski, R Jakes, M Goedert, 1997, Alpha-synuclein in Lewy bodies: Nat., v. 388, p. 839-840.

Stephan,A, S Davis, H Salin, S Dumas, J Mallet, S Laroche, 2002, Age-dependent differential regulation of genes encoding APP and alpha-synuclein in hippocampal synaptic plasticity: Hippocamp., v. 12, p. 55-62.

Stevens,CF, Wesseling JF (1999) Identification of a novel process limiting the rate of synaptic vesicle cycling at hippocampal synapses. Neuron 24:1017–1028.

Sudhof,TC, 2000, The synaptic vesicle cycle revisited: Neuron, v. 28, p. 317-320.

Sullivan,PG, N B Dragicevic, J H Deng, Y Bai, E Dimayuga, Q Ding, Q Chen, A J Bruce-Keller, J N Keller, 2004, Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover: J.Biol. Chem., v. 279, p. 20699-20707.

Szabo,C, 1996, DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 21, p. 855-869.

Tabrizi,SJ, M Orth, JM Wilkinson, JW Taanman, TT Warner, JM Cooper, AH Schapira, 2000, Expression of mutant alpha-synuclein causes increased susceptibility to dopamine Toxicity: *Hum.Mol.Genet.*, v. 9, p. 2683-2689.

Takahashi,H, K Wakabayashi, 2005, Controversy: is Parkinson's disease a single disease entity? Yes: *Parkinsonism.Relat.Disord.*, v. 11 Suppl 1, p. S31-S37.

Takahashi,N, L L Miner, I Sora, H Ujike, R S Revay, V Kostic, V Jackson-Lewis, S Przedborski, G R Uhl, 1997, VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity: *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, v. 94, p. 9938-9943.

Tanaka,Y, S Engelender, S Igarashi, R K Rao, T Wanner, R E Tanzi, A Sawa, L Dawson, T M Dawson, C A Ross, 2001, Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis: *Hum.Mol.Genet.*, v. 10, p. 919-926.

Tatton,NA, S J Kish, 1997, In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining: *Neurosci.*, v. 77, p. 1037-1048.

Teismann,P, B Ferger, 2000, The salicylate hydroxylation assay to measure hydroxyl free radicals induced by local application of glutamate in vivo or induced by the Fenton reaction in vitro: *Brain Res.Brain Res.Protoc.*, v. 5, p. 204-210.

Teismann, P and Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 2001, 39, 167-174.

Thomas,MP, K Chartrand, A Reynolds, V Vitvitsky, R Banerjee, HE Gendelman, 2007, Ion channel blockade attenuates aggregated alpha synuclein induction of microglial reactive oxygen species: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease: J. Neurochem., v. 100, p. 503-519.

Trepanier,G, D Furling, J Puymirat, M E Mirault, 1996, Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain: Neurosci., v. 75, p. 231-243.

Trepel, Martin; Neuroanatomie: Struktur und Funktion – München; Wien; Baltimore : Urban und Schwarzenberg,1995

Turmel,H, A Hartmann, K Parain, A Douhou, A Srinivasan, Y Agid, EC Hirsch, 2001, Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice: Mov.Disord., v. 16, p. 185-189.

Ueda,K, H Fukushima, E Masliah, Y Xia, A Iwai, M Yoshimoto, D A Otero, J Kondo, Y Ihara, T Saitoh, 1993, Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A, v. 90, p. 11282-11286.

Ueda,K, T Saitoh, H Mori, 1994, Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 205, p. 1366-1372.

Ungerstedt,U, 1968, 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons: Eur.J.Pharmacol., v. 5, p. 107-110.

Ungerstedt,U, 1971, Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour: Acta Physiol.Scand.Suppl., v. 367, p. 49-68.

Uversky,VN, A L Fink, 2002, Amino acid determinants of alpha-synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle: FEBS Lett., v. 522, p. 9-13.

Uversky,VN, J Li, P Souillac, I S Millett, S Doniach, R Jakes, M Goedert, A L Fink, 2002, Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins: J.Biol.Chem., v. 277, p. 11970-11978.

Varastet,M, D Riche, M Maziere, P Hantraye, 1994, Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease: Neurosci., v. 63, p. 47-56.

Vila,M, S Vukosavic, V Jackson-Lewis, M Neystat, M Jakowec, S Przedborski, 2000, Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP: J.Neurochem., v. 74, p. 721-729.

Voges,D, Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annu.Rev.Biochem., v.68, p. 1015–1068

Volles,MJ, P T Lansbury, Jr., 2002, Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism: Biochem., v. 41, p. 4595-4602.

Weinreb,PH, W Zhen, A W Poon, K A Conway, P T Lansbury, Jr., 1996, NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded: Biochem., v. 35, p. 13709-13715.

Wersinger,C, D Prou, P Vernier, A Sidhu, 2003, Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress: FASEB J., v. 17, p. 2151-2153.

Wersinger,C, A Sidhu, 2003, Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein: Neurosci. Lett., v. 340, p. 189-192.

West,MJ, L Slomianka, H J Gundersen, 1991, Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator: *Anat.Rec.*, v. 231, p. 482-497.

Wu,DC, P Teismann, K Tieu, M Vila, V Jackson-Lewis, H Ischiropoulos, S Przedborski, 2003, NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, p. 6145-6150.

Xu,J, S Y Kao, F J Lee, W Song, L W Jin, B A Yankner, 2002, Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease: *Nat.Med.*, v. 8, p. 600-606.

Xu,Z, D Cawthon, K A McCastlain, W Slikker, Jr., S F Ali, 2005, Selective alterations of gene expression in mice induced by MPTP: *Synapse*, v. 55, p. 45-51.

Yang,E, J Zha, J Jockel, L H Boise, C B Thompson, S J Korsmeyer, 1995, Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death: *Cell*, v. 80, p. 285-291.

Youdim,MB, D Ben Shachar, P Riederer, 1989, Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration?: *Acta.Neurol.Scand.Suppl.*, v. 126, p. 47-54.

Yu,S, X Zuo, Y Li, C Zhang, M Zhou, Y A Zhang, K Ueda, P Chan, 2004, Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells: *Neurosci. Lett.*, v. 367, p. 34-39.

Yu,S, K Ueda, P Chan, 2005, Alpha-synuclein and dopamine metabolism: *Mol. Neurobiol.*, v. 31, p. 243-254.

Zeng,BY, B Dass, A Owen, S Rose, C Cannizzaro, B C Tel, P Jenner, 2002, 6-Hydroxydopamine lesioning differentially affects alpha-synuclein mRNA expression

in the nucleus accumbens, striatum and substantia nigra of adult rats: *Neurosci. Lett.*, v. 322, p. 33-36.

Zha,J, H Harada, E Yang, J Jockel, S J Korsmeyer, 1996, Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L): *Cell*, v. 87, p. 619-628.

Zhang,W, T Wang, L Qin, H M Gao, B Wilson, S F Ali, W Zhang, J S Hong, B Liu, 2004, Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase: *FASEB J.*, v. 18, p. 589-591.

Zhang,W, T Wang, Z Pei, D S Miller, X Wu, M L Block, B Wilson, W Zhang, Y Zhou, J S Hong, J Zhang, 2005, Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease: *FASEB J.*, v. 19, p. 533-542.

Zhou,W, M S Hurlbert, J Schaack, K N Prasad, C R Freed, 2000, Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells: *Brain Res.*, v. 866, p. 33-43.

Zhou,ZD, B P Yap, A Y Gung, S M Leong, S T Ang, T M Lim, 2006, Dopamine-related and caspase-independent apoptosis in dopaminergic neurons induced by overexpression of human wild type or mutant alpha-synuclein: *Exp. Cell Res.*, v. 312, p. 156-170.

Zhu,M, J Li, A L Fink, 2003, The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation: *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 40186-40197.

7. Abkürzungsverzeichnis

A30P	Alanin-30-Prolin
A53T	Alanin-53-Threonin
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AS	Aminosäure
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CALB	Calbindin-D28k
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CuZnSOD	Kupfer-Zink Superoxid Dismutase
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DHBA	Dihydroxybenzoesäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylsäure
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
E1	Ub-aktivierendes Enzym
E2	Ub-konjugierendes Enzym
E3	Ub-Protein-Ligase
GABA	γ -Aminobutyrat
GPe	Globus pallidus externus
Gpi	Globus pallidus internus
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	reduziertes Glutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HVA	Homovanillinsäure
HWS	Halswirbelsäule

i.p.	intraperitoneal
K	Lysin-Akzeptor
kDA	kilo-Dalton
KO	knock-out
Lsg	Lösung
MAO	Monoaminoxidase
MAPkinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MFB	Mediale Vorderhirnbündel
MnSOD	Mangan Superoxid Dismutase
MPDP ⁺	1-Methyl-4-Phenyl-2,3-Dihydropyridium-Ion
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Ion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MSA	Multisystematrophie
NAc	Nucleus accumbens
NAC	non-A-beta-component
NACP	non-A-beta-component-precursor
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NO [·]	Stickstoffoxidradikal
NOS	NO-Synthase
3-NP	3-Nitropropionsäure
NST	Nucleus subthalamicus
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{-·}	Superoxid-Anionradikal
OH [·]	Hydroxylradikal
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PET	Positronen-Emissionstomographie
pH	pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
PLD1	Phospholipase D1
PLD2	Phospholipase D2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RRP	readily-releasable-Pools
s.c.	subkutan
SEM	standard error of the mean
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticularis
SOD	Superoxiddismutase
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
SNCA	α -Synuclein-Gen
StAb	Standardabweichung des Mittelwerts
Syn	Synuclein
TH	Tyrosinhydroxylase
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin Proteasomen System
UPM	Umdrehungen pro Minute
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
VTA	Ventrales Tegmentum
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

8. Bildnachweis

Abb. 2.1	Teil der Abb. aus Photo Impact XL Ulead Systems, Inc
Abb. 2.2, Abb. 2.6	Brochure- The Olympus Denmark C.A.S.T. - Grid System. Olympus DK A/S, Herstedøstervej 27-29, DK - 2620 Albertslund, Denmark Mouse Brain Library MBL
Abb. 2.3	A Human Brain Project/Neuroinformatics program funded by the National Institute of Mental Health, National Institute on Drug Abuse, and the National Science Foundation (P20-MH 62009).USA

Alle anderen Fotos, Grafiken, Abbildungen und Tabellen wurden selbständig gefertigt, gezeichnet. Bei Verwendung von Vorlagen und deren Modifikation wurden diese an entsprechender Stelle angegeben.

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die nachfolgend genannten Professorinnen/Professoren und Dozentinnen/Dozenten:

Arnold, Aumüller, Bach, Basler, Barth, Baum, Becker, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fruhsdorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Grau, Gressner, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Havemann, Hesse, Hilgermann, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Kroll, Krieg, Kummer, Lang, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mannheim, Mennel, Moll, Müller, Mutters, Radsak Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schmidt, Schnabel, Schneider, Seyberth, Slenczka, Sernal, Steiniger, Sturm, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

10. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Hartmann für die vertrauensvolle Annahme als Doktorand und für die Möglichkeit diese Dissertation erstellen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. W. H. Oertel für die Möglichkeiten, Voraussetzungen und Bedingungen, welche diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

An dieser Stelle möchte ich mich zudem besonders bei meinem Betreuer Dr. D. Alvarez-Fischer bedanken, der mir in allen Bereichen eine Hilfe war und bei der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit zur Seite stand. In ihm hatte ich einen verlässlichen Ansprechpartner, der auch nach seinem Gang ins Ausland und trotz der vielen Arbeit stets ein offenes Ohr und Zeit zur kritischen Durchsicht und Korrektur hatte.

Ich möchte auch der medizinisch-technischen Assistentin des Labors der Klinik für Neurologie Marburg Frau Sabine Anfimov für ihre Arbeit danken und für die problemlose Hilfe bei Anfragen.

Ich danke auch der Firma Olympus/Dänemark für die prompte und kompetente Hilfe bei technischen Problemen.

Meiner Familie danke ich für die geduldige Unterstützung, v.a. meinem Vater, der mir bei der Durchsicht des Manuskriptes mit seiner Erfahrung zur Seite stand.